

Efectos del glifosato y del fosfito de manganeso sobre la biología de
Macrophomina phaseolina.
Alternativas de control químico

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal.*

Agustina María Elesgaray
Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2011

Cátedra de Fitopatología – Facultad de Agronomía (UBA)



Escuela para Graduados Ing Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

©2015

Todos los derechos reservados

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marcelo Anibal Carmona

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Magister Scientiae en Producción vegetal (UBA)

Doctor en Ciencias Agrarias (UNLP)

Co-Directora

Karina Balestrasse

Bioquímica (UBA)

Doctora en el área de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)

Consejero de estudios

María Virginia López

Ingeniera Agrónoma (UBA)

Magister Scientiae en Biometría y Mejoramiento (UBA)

JURADO DE TESIS

JURADO

Daniel Ploper

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Tucumán)

Doctor of Philosophy (Purdue University)

JURADO

Julio Scursoni

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Doctor en Ciencias Agrarias (UBA)

JURADO

Jorge Zavala

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Doctor Rerum Naturalis (Universität Jena, Germany)

Fecha de defensa de la tesis: 13 de SEPTIEMBRE de 2016

Dedicatoria:

*A mi papá, que me mostró el camino y me alienta a seguir mis
sueños,*

*A mi novio, que me acompañó firmemente durante esta travesía y
hace mis días mejores,*

A mis amigas, que rieron y sufrieron conmigo,

A mi mamá, que me dio las bases para llegar hasta aquí,

A mi hermano, que nunca dejó de creer en mí...

Agradecimientos:

A Marcelo Carmona, por confiar en mí y darme la oportunidad de crecer como profesional y como persona.

A Karina Balestrasse, por introducirme al mundo de la bioquímica.

A Andrés, mi compañero, por comprenderme y contenerme, hasta en los peores momentos.

A mi papá, por el esfuerzo y el apoyo que me brindó durante este recorrido.

A Nati, por tu gran compañía y por trabajar codo a codo conmigo.

A Coty, por colaborar conmigo desde el primer día y resignar horas de tu tiempo libre para ayudarme.

A la gente de la Cátedra, profesores y compañeros, por recibirme y darme un lugar entre ustedes.

A Federico Spagnoletti, por estar siempre dispuesto a darme una mano.

A Jimena Vogrig, por la buena predisposición con el microscopio.

A Maxi y Marcos que estuvieron cuando los necesité.

A María Virginia López, por instruirme en los pormenores de la estadística con amabilidad y simpatía.

A Elida Patane, por ayudarme con los papeles, siempre con buena onda y una sonrisa.

A Julio Scursoni por su tiempo y asesoramiento.

A Andrés Martin, por asistirme con las aplicaciones de los tratamientos.

A Carla Zilli y Alejandra Hernández por su cooperación en la medición de enzimas.

A la gente de Spraytec S.R.L por hacer que esta tesis fuera posible

Y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron y me dieron aliento para seguir adelante.

¡Muchas gracias a todos!

Declaración:

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Ing Agr. Agustina Elesgaray

INDICE GENERAL

Índice general	xi
Índice de tablas.....	xv
Índice de figuras	xvii
Abreviaturas utilizadas	xxiii
Resumen	xxv
Abstract.....	xxvii
Capítulo I: Introducción general	29
1.1- INTRODUCCIÓN.....	31
1.1.1- <i>Macrophomina phaseolina</i> , un hongo habitante del suelo	31
1.1.2- El glifosato y su relación con las enfermedades	33
1.1.3- El sistema de defensa de las plantas	34
1.1.4- Fosfitos: su relación con los patógenos y las defensas de las plantas.....	35
1.1.5- Contexto actual	36
1.2- OBJETIVOS	36
1.2.1- Objetivo general.....	36
1.2.2- Objetivos particulares	36
1.3- HIPÓTESIS	37
Capítulo II: Efectos del fosfito de manganeso y del glifosato sobre el desarrollo micelial y estructuras de resistencia de <i>M. phaseolina</i> en experimentos <i>in vitro</i>	39
2.1- INTRODUCCIÓN.....	41
2.2- MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.3- RESULTADOS	44
2.4- DISCUSIÓN	53
2.5- CONCLUSIONES.....	54
Capítulo III: Impacto del glifosato y del fosfito de manganeso sobre la severidad de la podredumbre carbonosa (<i>M. phaseolina</i>) y variables agronómicas de interés en plantas de soja.....	55
3.1- INTRODUCCIÓN.....	57
3.2- MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.3- RESULTADOS	61
3.3.1- Severidad de la podredumbre carbonosa en raíces	61
3.3.2- Variables agronómicas de interés	63
3.3.2.1- Biomasa aérea	63
3.3.2.2- Biomasa radical.....	64
3.3.2.3- N° vainas/planta.....	65
3.4- DISCUSIÓN	65

3.5 CONCLUSIONES	68
Capítulo IV: Efectos del glifosato y del fosfito de manganeso <i>in vivo</i> sobre el estado oxidativo de plantas de soja RR y de enzimas relacionadas con la defensa	71
4.1- INTRODUCCIÓN	72
4.2- MATERIALES Y MÉTODOS	76
4.2.1- Determinación de parámetros de estrés oxidativo	77
4.2.1.1- Localización <i>in situ</i> de O_2^-	77
4.2.1.2- Localización <i>in situ</i> de H_2O_2	77
4.2.1.3- Determinación de TBARS	77
4.2.1.4- Determinación del contenido de GSH	78
4.2.2- Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa	78
4.2.2.- Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes	78
4.2.2.1.- Determinación de la actividad de CAT	78
4.2.2.2 - Determinación de la actividad de GR	78
4.2.2.3 - Determinación de la actividad de GPOX	79
4.2.2.2- Determinación de la actividad de las enzimas de defensa	79
4.2.2.4- Determinación de la actividad de PAL	79
4.2.2.5- Determinación de la actividad de PPO	79
4.2.2.6- Determinación de la actividad de β 1,3 glucanasa	81
4.2.2.7- Determinación de la actividad de LOX	81
4.2.3- Determinación de proteínas totales	81
4.3- RESULTADOS	82
4.3.1- Impacto de la infección de <i>M. phaseolina</i> <i>in vivo</i> sobre el estado oxidativo de plantas de soja RR y de enzimas relacionadas con la defensa (15 DDI)	82
4.3.1.1- Determinación de parámetros de estrés oxidativo	82
4.3.1.1.1- Localización <i>in situ</i> de O_2^-	82
4.3.1.1.2- Localización <i>in situ</i> de H_2O_2	83
4.3.1.1.3- Contenido de TBARS	84
4.3.1.1.4- Contenido de GSH	85
4.3.1.1.5- Actividad de las enzimas antioxidantes	86
4.3.1.1.6- Actividad de las enzimas de defensa	86
4.3.2- Efectos del glifosato y del Phi de Mn <i>in vivo</i> sobre el estado oxidativo de HOJAS de soja y de enzimas relacionadas con la defensa	89
4.3.2.1- Siete días desde aplicación (7 DDA)	89
4.3.2.1.1- Contenido de TBARS	89
4.3.2.1.2- Contenido de GSH	91
4.3.2.1.3- Actividad de las enzimas antioxidantes	92
4.3.2.1.4- Actividad de las enzimas de defensa	94

4.3.2.2- Treinta y siete días desde aplicación (37 DDA)	97
4.3.2.2.1- Contenido de TBARS	97
4.3.2.2.2- Contenido de GSH	98
4.3.2.2.3- Actividad de las enzimas antioxidantes	98
4.3.2.2.4- Actividad de las enzimas de defensa	101
4.3.3- Efectos del glifosato y del Phi Mn <i>in vivo</i> sobre el estado oxidativo de RAÍCES de soja y de enzimas relacionadas con la defensa	103
4.3.3.1- Siete días desde aplicación (7 DDA)	103
4.3.3.1.1- Contenido de TBARS	103
4.3.3.1.2- Contenido de GSH	104
4.3.3.1.3- Actividad de las enzimas antioxidantes	104
4.3.3.1.4- Actividad de las enzimas de defensa	107
4.3.3.2- Treinta y siete días desde aplicación (37 DDA)	109
4.3.3.2.1- Contenido de TBARS	109
4.3.3.2.2- Contenido de GSH	111
4.3.3.2.3- Actividad de las enzimas antioxidantes	112
4.3.3.2.4- Actividad de las enzimas de defensa	114
4.3.4. Relación entre la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa en raíz 37 DDA, las UFC/g de raíz y los tratamientos	117
4.4- DISCUSIÓN	119
4.5- CONCLUSIONES	123
Capítulo V: Consideraciones finales	126
5.1.- Síntesis de los principales resultados	128
5.2.- Avances logrados en el conocimiento	130
5.3.- Aplicaciones futuras	131
5.4.- Implicancias futuras	131
Capítulo VI: Bibliografía	134
Apéndice	152
7.1- Composición del glifosato** utilizado:	154
7.2- Composición del Phi Mn** utilizado:	154
7.3- Composición del sustrato** utilizado:	154
7.3.1- Propiedades físico-químicas:	154
7.4- Solución madre de glifosato	154
7.5- Inóculo de <i>M. phaseolina</i> sobre arroz	155

ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla 3.1</u> Porcentaje de control de la severidad de la podredumbre carbonosa en raíces de soja por cada tratamiento vs. el testigo inoculado (<i>M. phaseolina</i>) y vs. glifosato sólo, 37 días después de la aplicación.....	62
<u>Tabla 4.1</u> Actividad media para las enzimas CAT, GR y GPOX y % de variación de la actividad de las mismas para los distintos tratamientos respecto del testigo, en hojas y raíces de soja, 15 días después de la inoculación con <i>M. phaseolina</i> . Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC).....	87
<u>Tabla 4.2</u> Media de la actividad de las enzimas PAL, PPO, β 1,3 glucanasa y LOX y su % de variación para los distintos tratamientos respecto del testigo en hojas de soja, 15 días después de la inoculación con <i>M. phaseolina</i> . Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC).....	88
<u>Tabla 4.3</u> Diferencias porcentuales de la actividad de las enzimas CAT, GR y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para hojas de soja, 7 días después de la inoculación. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato).....	94
<u>Tabla 4.4</u> Diferencias porcentuales de la actividad de las enzimas PAL, PPO y β 1,3 glucanasa para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) en hojas de soja, 7 días después de la aplicación. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato). ...	95
<u>Tabla 4.5</u> Diferencias porcentuales de la actividad promedio de las enzimas CAT, GR y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para hojas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato)	99
<u>Tabla 4.6</u> Diferencias porcentuales de la actividad promedio de las enzimas PAL, PPO y β 1,3 glucanasa para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para hojas de soja, 37 días después de la aplicación. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato).	101
<u>Tabla 4.7</u> Diferencias porcentuales de la actividad media de las enzimas GR y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato)	105
<u>Tabla 4.8</u> Diferencias porcentuales de la actividad media de las enzimas PAL, PPO, β 1,3 glucanasa y LOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 7 días después de la aplicación. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato).....	107
<u>Tabla 4.9</u> Diferencias porcentuales de la actividad media de las enzimas CAT y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 37 días después de la aplicación. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato)	112
<u>Tabla 4.10</u> Diferencias porcentuales de la actividad de las enzimas PPO y LOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 37 días después de la aplicación. (M.p: <i>Macrophomina phaseolina</i> , glifo: glifosato).	116
<u>Tabla 4.11</u> Autovalores y proporción de la variabilidad total explicada por las distintas componentes (Análisis de Componentes Principales).	117

<u>Tabla 4.12</u> Correlación de las distintas componentes con las variables originales (Análisis de Componentes principales).....	117
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.1</u> Distintas etapas de la podredumbre carbonosa en plantas de soja. Plántula atacada por <i>M. phaseolina</i> (A); microesclerocios de <i>M. phaseolina</i> en raíces (B); lesiones causadas por <i>M. phaseolina</i> en la base del tallo (C).	32
<u>Figura 2.1</u> Sistema de zonas de la escala de grises (Adams y Baker, 1981) utilizado para determinar las diferencias de coloración en los microesclerocios de <i>M. phaseolina</i> para los distintos tratamientos. La escala divide las tonalidades entre el blanco y el negro en zonas fáciles de distinguir por el ojo humano.	43
<u>Figura 2.2</u> Concentración inhibitoria 50 (CI50) y concentración inhibitoria 95 (CI95) promedio de <i>M. phaseolina</i> para los tratamientos glifosato, Phi Mn y glifosato + Phi Mn. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Letras mayúsculas: CI50; letras minúsculas: CI95.	45
<u>Figura 2.3</u> Desarrollo <i>in vitro</i> del patógeno <i>M. phaseolina</i> en medio de cultivo APG mezclado con distintas concentraciones de Phi Mn (ppm), al 4to día de incubación en oscuridad a 28°C.	46
<u>Figura 2.4</u> Desarrollo <i>in vitro</i> del patógeno <i>M. phaseolina</i> en medio de cultivo APG mezclado con distintas concentraciones de glifosato (ppm), al 4to día de incubación en oscuridad a 28°C.	47
<u>Figura 2.5</u> Desarrollo <i>in vitro</i> del patógeno <i>M. phaseolina</i> en medio de cultivo APG mezclado con distintas concentraciones de glifosato + Phi Mn (ppm), al 4to día de incubación en oscuridad a 28°C.	48
<u>Figura 2.6</u> Microesclerocios de <i>M. phaseolina</i> creciendo en medio de cultivo APG sólo (A) y con 100 ppm de: glifosato (B), Phi Mn (C) o glifosato + Phi Mn (D). Fotografías tomadas en microscopio óptico a 10X, luego de 4 días de incubación en oscuridad a 28°C.	50
<u>Figura 2.7</u> Microesclerocios de <i>M. phaseolina</i> creciendo en medio de cultivo APG sólo (A) y con 100 ppm de: glifosato (B), Phi Mn (C) y glifosato + Phi Mn (D). Fotografías tomadas en microscopio óptico a 40X, luego de 4 días de incubación en oscuridad a 28°C.	51
<u>Figura 2.8</u> Microesclerocios de <i>M. phaseolina</i> creciendo en medio de cultivo APG sólo (A) y con 300 ppm de: glifosato (B), Phi Mn (C) y glifosato + Phi Mn (D). Fotografías tomadas en microscopio óptico a 40X, luego de 4 días de incubación en oscuridad a 28°C.	52
<u>Figura 3.1</u> Experimento en plantas de soja inoculada con <i>M. phaseolina</i> y tratada con glifosato, Phi Mn y glifosato + Phi Mn en macetas en invernáculo, al cabo del cual se evaluó la severidad de la podredumbre carbonosa en raíces.	59
<u>Figura 3.2</u> Aplicación de glifosato a razón de 2,5 L/ha., 22 días post-emergencia de las plantas de soja (estado fenológico V4). El tratamiento de Phi Mn y el tratamiento mezcla de glifosato + Phi Mn se aplicaron de igual forma, a razón de 0,2 L/ha y 2,5 L/ha + 0,2 L/ha, respectivamente.	59
<u>Figura 3.3</u> Proceso de realización de la técnica de medición de UFC /g raíz de soja. Lavado de raíces (A); raíces molidas (B); desinfección superficial del polvo de raíz en tubo eppendorf (C); sembrado de la suspensión de raíz en medio selectivo (D); placas de petri listas para incubar (E); UFC de <i>M. phaseolina</i> , después de 3 días de incubación a 28°C (F).	60

<u>Figura 3.4</u> UFC de <i>M. phaseolina</i> /g raíz promedio en función de las combinaciones de los factores glifosato y Phi Mn, 37 días después de la aplicación de los tratamientos Las barras sobre los puntos indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).	61
<u>Figura 3.5</u> UFC de <i>M. phaseolina</i> /0,005 g de raíz de soja para los distintos tratamientos, 37 días después de la aplicación de los mismos.	62
<u>Figura 3.6</u> Biomasa aérea promedio de plantas de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas representan los desvíos estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).	63
<u>Figura 3.7</u> Biomasa radical promedio de plantas de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos probados. Las barras sobre las columnas representan los desvíos estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).	64
<u>Figura 3.8</u> Número de vainas/planta de soja promedio 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas representan los desvíos estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).	65
<u>Figura 4.1</u> Representación esquemática de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las plantas. La activación del O ₂ ocurre mediante dos mecanismos diferentes: la reducción monovalente gradual de O ₂ conduce a la formación de O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ y OH [•] , mientras que la transferencia de energía a O ₂ conduce a la formación de ¹ O ₂ . El O ₂ ⁻ es fácilmente dismutado a H ₂ O ₂ bien de forma no enzimática o mediante la enzima SOD. El H ₂ O ₂ es convertido en H ₂ O por las enzimas CAT, GPOX, y APX. La enzima GR interviene en la regeneración de Glutati6n oxidado (GSSG) a Glutati6n reducido (GSH), el cual permite la dismutaci6n no enzimática de H ₂ O ₂ a H ₂ O. Adaptado de Sharma <i>et al.</i> (2012) y Racchi (2013).	72
<u>Figura 4.2</u> Representaci6n esquemática de la vía de los fenilpropanoides en donde interviene la enzima PAL. Esta enzima es un precursor de compuestos fundamentales para la defensa de la planta como fitoalexinas y lignina. C4H: cinamato-4-hidrolasa; 4CL: 4-Cumarato CoA ligasa. Adaptado de Sriprasertsak <i>et al.</i> (2002) y Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos (2012).	73
<u>Figura 4.3</u> Representaci6n esquemática de la oxidaci6n del ácido cafeico, proveniente de la vía de los fenilpropanoides, por la enzima PPO. Para simplificar, los pasos de isomerizaci6n cis-trans no se muestran. La flecha punteada representa múltiples reacciones. Adaptado de Sato (1967) y Arají <i>et al.</i> (2014).	74
<u>Figura 4.4</u> Representaci6n esquemática del metabolismo de las oxilipinas donde interviene la enzima LOX. La flecha punteada representa múltiples reacciones. HPL: Hidroperóxido liasa; AOS: aleno óxido sintasa; POX: peroxigenasa. Adaptado de Robinson y Bostock (2015) y Yan <i>et al.</i> (2013).	74
<u>Figura 4.5</u> Representaci6n esquemática de la acci6n de las β 1,3 glucanasas en la defensa de las plantas (Nishizawa, 2005).	75
<u>Figura 4.6</u> Proceso de extracci6n proteica: muestras de tejido foliar de soja pesadas y listas para congelar a -40°C (A); disposici6n del Buffer de extracci6n dentro de las bolsas de muestras de tejido de soja (B); extracto obtenido al machacar las muestras mencionadas (C).	80
<u>Figura 4.7</u> Raíces de soja teñidas con NBT (azul de nitrotetrazolio). Izq.: testigo; der: raíces inoculadas con el pat6geno (<i>M. phaseolina</i>).	82

- Figura 4.8 Raíces de soja teñidas con DAB (3,3'-Diaminobencidina). Izq.: testigo; der: raíces inoculadas con el patógeno (*M. phaseolina*).....83
- Figura 4.9 Contenido promedio de TBARS para muestras de hojas y raíces de soja para dos tratamientos: Testigo (columnas blancas) y *M. phaseolina* (columnas negras), 15 días después de la inoculación. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para hoja y raíz ($p < 0,05$) (Test DGC). Los números entre paréntesis indican % de variación del contenido de TBARS respecto del testigo.....84
- Figura 4.10 Contenido medio de GSH para muestras de hojas y raíces de soja para dos tratamientos: Testigo (columnas blancas) y *M. phaseolina* (columnas negras), 15 días después de la inoculación. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para hoja y para raíz ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican % de variación del contenido de GSH respecto del testigo.....85
- Figura 4.11 Contenido medio de TBARS en hojas de soja, 7 días después la aplicación de los tratamientos. Se presentan las únicas interacciones entre factores que resultaron significativas: *M. phaseolina*-glifosato (1) y glifosato-Phi Mn (2). Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas al 5% (Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de TBARS para los distintos tratamientos, respecto de los testigos sanos y testigos inoculados (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)90
- Figura 4.12 Contenido medio de GSH en hojas de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican % de variación del contenido de GSH para los distintos tratamientos, con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).....91
- Figura 4.13 Actividad media de las enzimas antioxidantes CAT (1), GR (2) y GPOX (3) medidas en hojas de plantas de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)93
- Figura 4.14 Actividad media de las enzimas PAL (1), PPO (2), β 1,3 glucanasa (3) y LOX (4) en hojas de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Para LOX se muestra la única interacción entre factores que resultó significativa: glifosato- Phi Mn. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan el % de variación de la actividad de cada enzima para los distintos tratamientos vs los testigos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).....96
- Figura 4.15 Contenido promedio de TBARS en hojas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de TBARS para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)97
- Figura 4.16 Contenido medio de GSH en hojas soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias.

- Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de GSH para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)98
- Figura 4.17 Actividad media de las enzimas CAT (1), GR (2) y GPOX (3) en hojas de plantas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).....100
- Figura 4.18 Actividad media de las enzimas de defensa PAL (1), PPO (2), β 1,3 glucanasa (3) y LOX (4) en hojas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. En el caso de LOX (4) se muestra la única interacción entre factores significativa al 5%: glifosato-Phi Mn. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan diferencias porcentuales de la actividad enzimática para los distintos tratamientos vs. los testigos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)102
- Figura 4.19 Contenido medio de TBARS en muestras de raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de TBARS para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)103
- Figura 4.20 Contenido medio de GSH en muestras de raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan diferencias porcentuales del contenido de GSH para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)104
- Figura 4.21 Actividad media para las enzimas antioxidantes CAT (1) y (2), GR (3) y GPOX (4) en raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. En el caso de CAT se muestran los factores que resultaron significativos: *M. phaseolina* (1) y Phi Mn (2). Las barras indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan diferencias porcentuales de la actividad de CAT entre los distintos tratamientos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).106
- Figura 4.22 Actividad de las enzimas PAL (1), PPO (2), β 1,3 glucanasa (3) y LOX (4) en raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).....108
- Figura 4.23 Contenido medio de TBARS en raíces de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Sólo se muestran las interacciones significativas entre factores. En el gráfico (1) se observa la interacción *M. phaseolina*-glifosato. En el gráfico (2) se muestra la interacción glifosato-Phi Mn. En el gráfico (3) se presenta la interacción de *M. phaseolina*-Phi Mn. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas al 5% (Test DGC). Los números entre paréntesis representan las diferencias

- porcentuales del contenido de TBARS con respecto a los testigos y a *M. phaseolina* (**) (M.p: *Macrophomina phaseolina*)110
- Figura 4.24 Contenido medio de GSH en raíces de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos para el único factor que resultó significativo: *M. phaseolina*. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). El número entre paréntesis representa la diferencia porcentual del contenido medio de GSH respecto del testigo. (M.p: *Macrophomina phaseolina*).....111
- Figura 4.25 Actividad media de las enzimas CAT (1), GR (2) y GPOX (3) en raíces de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). El número entre paréntesis representa el % de variación de la actividad de GR para los tratamientos con glifosato respecto de los que no contenían el herbicida. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).113
- Figura 4.26 Actividad media para las enzimas PAL (1) y β 1,3 glucanasa (2 y 3) en raíces de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Sólo se muestran las interacciones que resultaron significativas. Para la PAL, la interacción de *M. phaseolina* -glifosato (1). Para la β 1,3 glucanasa, las interacciones, *M. phaseolina* -Phi Mn (2) y *M. phaseolina* -glifosato (3). Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan la diferencia porcentual de la actividad de las enzimas para los distintos tratamientos respecto de los testigos y de *M. phaseolina* (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)115
- Figura 4.27 Actividad media de las enzimas PPO (1) y LOX (2) en raíces de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)116
- Figura 4.28 Biplot de la relación entre las enzimas antioxidantes y de defensa y parámetros del estrés oxidativo con las UFC de *M. phaseolina*/g de raíz y los tratamientos probados en raíces de soja, 37 días después de la aplicación (Análisis de Componentes principales).118
- Figura 4.29 Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de los compuestos antioxidantes de la planta. Las flechas de colores indican incremento (\uparrow) o reducción (\downarrow) de la actividad. No se muestran las flechas en los casos en lo que los tratamientos no hayan generado diferencias concluyentes. Las ERO: O_2^- y H_2O_2 , sólo fueron medidas para *M. phaseolina*, 15 días después de la inoculación. Adaptado de Sharma et al., 2012 y Racchi, 2013.120
- Figura 4.30 Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de la enzima PAL y, por lo tanto, los productos de la vía de los fenilpropanoides. Las flechas de colores indican incremento (\uparrow) o reducción (\downarrow) de la actividad de dicha enzima. Adaptado de Sriprasertsak et al. (2002) y Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos (2012).121
- Figura 4.31 Efecto de los tratamientos glifosato (flechas amarillas) y glifosato + Phi Mn (flechas rojas) sobre la expresión de la enzima PPO. Las flechas de colores indican incremento (\uparrow) o reducción (\downarrow) de la actividad de dicha enzima. Los demás tratamientos no mostraron evidencias concluyentes de aumento/disminución de la actividad de la enzima. Adaptado de Sato (1967) y Araji et al. (2014).122
- Figura 4.32 Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la enzima LOX. Las flechas de colores indican incremento (\uparrow) o reducción (\downarrow) de la actividad de dicha enzima. Adaptado de Robinson y Bostock (2015) y Yan et al. (2013).122

Figura 4.33 Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la enzima β 1,3 glucanasa. Las flechas de colores indican incremento (\uparrow) o reducción (\downarrow) de la actividad de la misma.

Esquema adaptado de Nishizawa (2005)123

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Phi	fosfito
M.p	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Phi Mn	fosfito de manganeso
Phi K	fosfito de potasio
glifo	glifosato
SAR	resistencia sistémica adquirida
ISR	resistencia sistémica inducida
SA	ácido salicílico
HR	respuesta de hipersensibilidad
ROS	especies reactivas del oxígeno
PRP	proteínas relacionadas con la patogénesis
PGPR	bacterias promotoras del crecimiento
JA	ácido jasmónico
ET	etileno
DDA	días desde aplicación
DDI	días desde inoculación
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
GSH	glutación reducido
CAT	catalasa
GPOX	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
PAL	fenilalanina amonio liasa
PPO	polifenoloxidasas
LOX	lipoxigenasa

Efectos del glifosato y del fosfito de manganeso sobre la biología de
Macrophomina phaseolina.
Alternativas de control químico

Resumen:

El hongo *Macrophomina phaseolina* es el agente causal de la podredumbre carbonosa de la base del tallo, una patología muy relevante en soja. El glifosato es el herbicida más utilizado en la historia de la agricultura. Existen antecedentes que demuestran que el glifosato reduce las defensas de las plantas. Los fosfitos (Phi) son sales derivadas del ácido fosforoso combinadas con diferentes cationes. Son activadores de las defensas en las plantas y tienen un efecto antifúngico directo, especialmente en Oomycetes. El presente proyecto cumplió con los objetivos de: 1) evaluar el impacto *in vitro* del glifosato, Phi Mn y su combinación, sobre el crecimiento y formación de microesclerocios de *M. phaseolina*; 2) estudiar el efecto de las aplicaciones de estos tratamientos sobre la severidad de la podredumbre carbonosa en soja y, 3) cuantificar los cambios producidos *in vivo* en la respuesta de las defensas de la soja a este patógeno frente a dichos tratamientos. El Phi de Mn presentó la menor CI₅₀ (321 ppm), y el glifosato + Phi Mn generó una notable pérdida de coloración en los microesclerocios. También se determinó que la mezcla de glifosato + Phi Mn redujo en un 30% la severidad de la enfermedad. Además, el tratamiento *M. phaseolina* + glifosato + Phi Mn mostró un aumento significativo de la expresión de las enzimas antioxidantes y de defensa. Se concluyó que los efectos asociativos del glifosato y el Phi Mn fueron significativos, tanto en su efecto *in vitro* sobre los microesclerocios, como en la reducción de la severidad de la enfermedad, y en la inducción de las enzimas antioxidantes y de defensa en plantas de soja RR. Este es el primer estudio realizado sobre el Phi Mn, el glifosato, la mezcla de ambos y sus efectos sobre la podredumbre carbonosa en soja RR.

Abstract:

The fungus *Macrophomina phaseolina* is the causal agent of charcoal rot, a very important pathology in soybean. Glyphosate is the most widely used herbicide in the history of agriculture. There are precedents that show that glyphosate reduces plant defense. Phosphites (Phi) are salts derived from phosphorous acid combined with different cations. They activate defense in plants and have a direct antifungal effect, especially on Oomycetes. The main objectives of this project were: 1) to evaluate the impact of glyphosate, Mn Phi, and their combination, *in vitro* on *M. phaseolina*'s mycelial growth and microesclerotia; 2) to study the *in vivo* application effects of these treatments on the severity of charcoal rot in soybean, and 3) to quantify the changes produced by such treatments in enzymatic defense *in vivo* against this pathogen. The Mn Phi had the lowest IC₅₀, and glyphosate + Mn Phi generated a significant decrease of microsclerotia pigmentation. It was also found that the mixture of glyphosate + Mn Phi significantly reduced disease severity. Furthermore, treatment *M. phaseolina* + glyphosate + Mn Phi showed a significant increase in the expression of antioxidant enzymes and defense. It was concluded that the associative effects of glyphosate and Mn Phi were significant in its effect *in vitro* on microsclerotia, as in reducing the severity of the disease and in the induction of antioxidant enzymes and defense in RR soybean. This is the first study that analyzes the effects of Mn Phi, glyphosate and the mixture of both on RR soybean charcoal rot.

Capítulo I:

Introducción general

1.1- INTRODUCCIÓN

1.1.1- *Macrophomina phaseolina*, un hongo habitante del suelo

Entre los factores que limitan la producción y calidad de las semillas de soja (*Glycine max* L.) se destacan las enfermedades fúngicas (Hartman *et al.*, 1999; Chawla *et al.*, 2013).

El hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich es un fitopatógeno, saprófito facultativo que sobrevive en el suelo mediante la formación de microesclerocios (Shaner *et al.*, 1999; Chamorro *et al.*, 2015). Este patógeno también persiste en restos de plantas infectadas y semillas, los que, junto con los microesclerocios, actúan como fuente primaria de inóculo (Pérez Brandan *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2009). Es el agente causal de la podredumbre carbonosa de la base del tallo, una patología mundial que afecta a la soja y a otros cultivos agrícolas y forestales (Gupta *et al.*, 2012). La enfermedad puede aparecer en cualquier estado fenológico del cultivo y su aparición causa elevados porcentajes de plantas muertas en los lotes, registrándose daños en el rendimiento debidos a su ataque de entre el 60 y el 93% (Pérez Brandan *et al.*, 2009).

Los síntomas de la enfermedad varían dependiendo del momento del año en el cual la planta se infecta, del potencial de inóculo, virulencia de la cepa, susceptibilidad del hospedante y condiciones ambientales y edáficas (Ploper *et al.*, 2001). En soja, genera maduración temprana, clorosis y llenado incompleto de las vainas (Partridge, 2005). En las plántulas se observan lesiones irregulares en la base de los cotiledones, con decoloración castaña rojiza (Fig. 1.1 (A)), oscureciéndose posteriormente, las que se extienden por el tallo causando estrangulamiento y muerte.

Se genera una pudrición marrón a marrón oscuro. En plantas adultas causa la obstrucción del sistema vascular por la producción de microesclerocios de color negro a gris, debajo de la corteza y en la médula (Fig. 1.1 (B)), llevando al marchitamiento y muerte de las plantas. En esta etapa se observan lesiones negruzco-grisáceas en la base de los tallos (Fig. 1.1 (C)), muchas veces con líneas oscuras en la médula (Pérez Brandan *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2009).

Las condiciones ambientales predisponentes para el establecimiento de esta enfermedad son altas temperaturas y sequías, imperantes en regiones con climas tropicales y subtropicales. La temperatura óptima para el desarrollo del hongo se ubica en el rango de los 28 a 35°C (Pérez Brandan *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2009).

Este patógeno, puede infectar la raíz y la parte inferior del tallo de más de 500 especies de plantas (Valiente *et al.*, 2008). De todos los hongos que afectan las raíces de la planta de soja, *M. phaseolina* merece la mayor atención, debido a que la enfermedad que causa está incrementándose sostenidamente, independientemente del manejo o rotación agrícola utilizada. Por ello, se espera un crecimiento continuado de la importancia de este patógeno en la mayoría de los países productores de soja (Carmona y Reis, 2012).

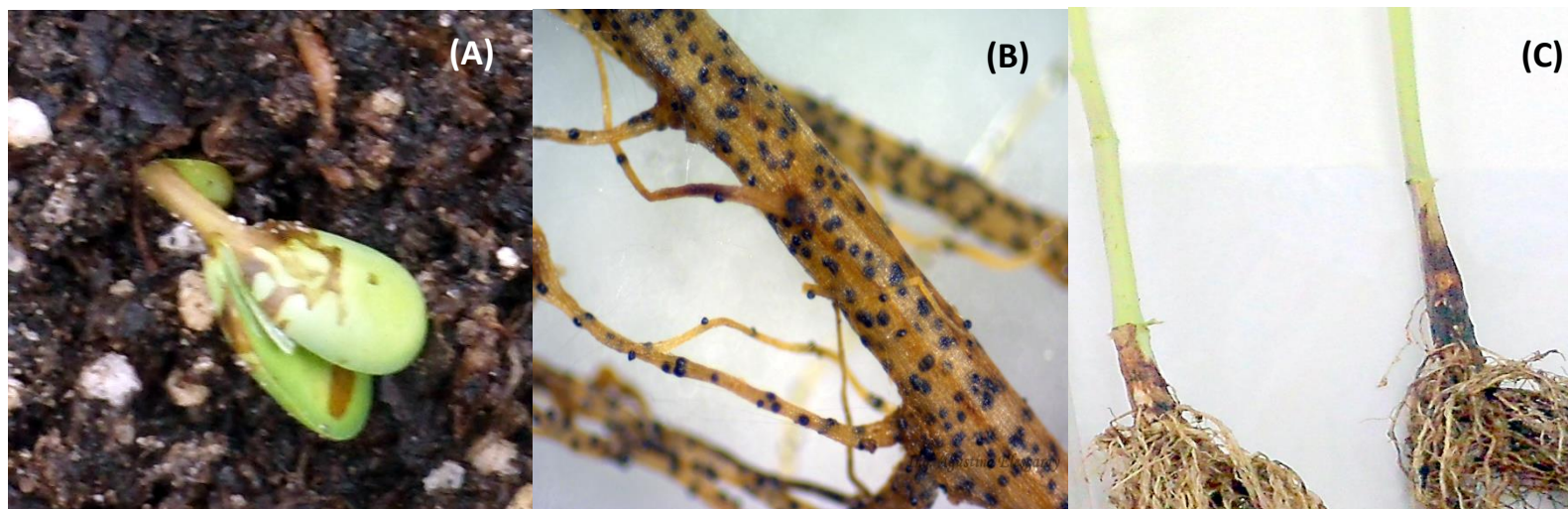


Figura 1.1 Distintas etapas de la podredumbre carbonosa en plantas de soja. Plántula atacada por *M. phaseolina* (A); microesclerocios de *M. phaseolina* en raíces (B); lesiones causadas por *M. phaseolina* en la base del tallo (C).

La problemática del manejo del patógeno radica en varios puntos. En primer lugar, no existen cultivares de soja con niveles adecuados de resistencia genética al mismo (Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Por otra parte, los fungicidas utilizados para controlar este hongo se ven limitados al tratamiento de semilla y/o de suelo (Gupta *et al.*, 2012). Esto se debe a que los fungicidas de aplicación foliar no se traslocan hacia las raíces (Gisi *et al.*, 2002), donde ataca *M. phaseolina*. Asimismo, la formación de microesclerocios le permite sobrevivir y multiplicarse en residuos de cosecha o vivir saprofiticamente en materia orgánica en descomposición (Pearson *et al.*, 1984). Estas estructuras de resistencia, permanecen libres en el suelo conforme los residuos se descomponen pudiendo mantenerse viables por más de cuatro años (Gill-Langarica y Mayek-Pérez, 2008).

Estas características, sumadas a los hábitos polífagos del hongo obstaculizan su manejo mediante rotación de cultivos (Almeida *et al.*, 2002).

1.1.2- El glifosato y su relación con las enfermedades

Desde su introducción en 1996, la soja resistente al glifosato (RR) ha sido adoptada masivamente por los agricultores (Carpenter y Gianessi, 1999). En Argentina, la tasa de adopción de estos materiales fue similar a la de los maíces híbridos en Estados Unidos en la década de 1930 (Trigo, 2011).

Existen varios factores que contribuyeron a la adopción de esta tecnología. Uno de los principales es que los programas de manejo de malezas en cultivos resistentes al glifosato han aportado un control de malezas muy eficaz, a bajo costo, simplificando decisiones de manejo de herbicidas, y generando productos de cosecha más limpios (Johal y Huber, 2009). Por otra parte, la posibilidad de aplicar este herbicida en post-emergencia ha contribuido al uso de prácticas de labranza conservacionistas o labranza cero; permitiendo aprovechar las ventajas que éstas suponen. Asimismo, la ventana de aplicación del glifosato es más amplia que la de otros herbicidas post-emergentes utilizados anteriormente en cultivos de soja (Carpenter y Gianessi, 1999).

El escenario descripto hizo que el glifosato, N-(fosfonometil) glicina, se convierta en el herbicida más ampliamente utilizado en la historia de la agricultura (Johal y Huber, 2009). Actualmente se utilizan en el mundo 2000 millones de litros de este herbicida por año y nuestro país posee el 8,5% de este consumo (Vera, 2011).

Más allá de las ventajas que se obtienen del uso del glifosato, éste también puede conllevar efectos no deseados (Johal y Huber, 2009). Además de la aparición de malezas resistentes (Powles, 2008), se ha informado que muchos herbicidas, incluido el glifosato, influyen la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Evans *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2004, 2005). Esto puede incrementar algunas enfermedades específicas de las plantas, como el síndrome de muerte súbita causado por *Fusarium solani* f. sp. *glycines* en soja (Altman y Campbell, 1977; Mekwatanakarn y Sivasithamparam, 1987; Hornby *et al.*, 1998; Sanogo *et al.*, 2000).

El glifosato es uno de los herbicidas que impacta en las comunidades microbianas que habitan el suelo (Conde, 2011). Se observaron cambios transitorios en variables microbiológicas tales como el carbono de la biomasa microbiana y la respiración

edáfica en suelos cultivados con soja tratada con glifosato (Bozzo, 2010). Asimismo, existen reportes que indican que este herbicida genera una merma en la población de microorganismos reductores de Mn (Johal y Huber, 2009). Los micronutrientes son activadores o inhibidores de muchas funciones fisiológicas críticas. Por lo tanto, una deficiencia o cambio en la disponibilidad de estos elementos regulatorios podría afectar el crecimiento y resistencia de la planta a enfermedades y plagas (Datnoff *et al.*, 2007).

El glifosato es un fuerte quelante sistémico. Su acción herbicida se basa en ligarse con Mn, un cofactor de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-fosfato sintasa (EPSPS) en la vía metabólica del shikimato, para inhibir este camino metabólico tanto en plantas como en microorganismos. Bloquea la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales precursores de otros compuestos aromáticos críticos, incluyendo reguladores del crecimiento y fitoalexinas, suprimiendo los mecanismos de defensa contra patógenos (Duke *et al.*, 2003).

Según Johal y Huber (2009), la predisposición de las plantas a la infección por microorganismos debida al uso extensivo del glifosato es un factor significativo en el aumento de la severidad o “reemergencia” de enfermedades que alguna vez se consideraron eficazmente manejadas. Se ha demostrado que dicho herbicida aumenta la predisposición a enfermedades específicas causadas por patógenos tales como *Corynespora cassiicola* (Berk. y Curt.), *Fusarium tucumaniae* (T. Aoki, O'Donnell, Yos. Homma y Lattanzi), *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium virguliforme* (O'Donnell y T. Aoki), y *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *betae*, entre otros (Huber *et al.*, 2005; Johal y Huber, 2009; Larson *et al.*, 2006).

1.1.3- El sistema de defensa de las plantas

Las plantas poseen un complejo sistema de defensa enzimático y no enzimático. A nivel celular, todos los estreses se manifiestan como un daño oxidativo que altera las funciones metabólicas principales para el crecimiento de las plantas y por ende su productividad (Scandalios, 2002). Las ROS (especies reactivas del oxígeno), responsables de ese daño oxidativo, se producen en todos los organismos aeróbicos y, normalmente, existen dentro de las células en balance con las moléculas antioxidantes. Algunas proteínas antioxidantes como la catalasa (CAT), están relacionadas con el estado redox e intervienen en los procesos de muerte y proliferación celular. Además las ROS pueden participar en la activación o silenciamiento de genes y de factores de transcripción que llevan a la inducción de enzimas de defensa y de proteínas estructurales (Laloi *et al.*, 2004; Thorpe *et al.*, 2004).

La producción de dichas enzimas de defensa, debido a un estrés o a la invasión de un microorganismo extraño, puede desencadenar mecanismos de resistencia en la planta. Existen dos tipos de resistencia: la Resistencia Sistémica Adquirida y la Resistencia Sistémica Inducida. Ambos tipos de resistencia son efectivas contra un amplio espectro de patógenos y su efecto es a largo plazo (Moffat, 1992).

Se llama Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) a aquella que se genera cuando la planta es víctima de un primer patógeno infectante o algún daño causado por factores abióticos que estimula la expresión de reacciones de resistencia contra patógenos o daños subsecuentes (Camarena Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007). En este tipo de resistencia el ácido salicílico (SA) cumple una función clave: es necesaria su acumulación para que se produzca la SAR (Pieterse *et al.*, 2009).

Luego de la formación de una lesión necrótica, ya sea como parte de una respuesta de hipersensibilidad (HR) o como un síntoma de una enfermedad, la vía metabólica de la SAR es activada. La activación de la SAR resulta en el desarrollo de una resistencia sistémica de amplio espectro (Durrant y Dong, 2004). La secuencia de eventos que permiten la respuesta sistémica comienza localmente; es decir, en las células adyacentes a la HR. Se observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina, deposición de calosa y la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Camarena Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

En general, el aumento de la resistencia de la planta se debe a la inducción de genes de síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP) y acumulación de fitoalexinas (Durrant y Dong, 2004; Carmona y Sautua, 2011).

La Resistencia Sistémica Inducida (ISR), en cambio, es provocada por rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) (van Loon, 2000). Las bacterias PGPR mejor caracterizadas son las cepas de varias especies de *Pseudomonas* que no causan daños visibles en el sistema de raíces de las plantas (Bakker *et al.*, 2007). La ISR no causa la acumulación de PRP ni acumulación de SA, sino que utiliza vías reguladas por el ácido jasmónico y el etileno (JA/ET) (Valland y Goodman, 2004).

1.1.4- Fosfitos: su relación con los patógenos y las defensas de las plantas

Los fosfitos (Phi) son sales derivadas del ácido fosforoso (H_3PO_3) combinadas con diferentes cationes (Mn^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , etc.). Su uso actual en la agricultura se basa en evidencias que indican que son activadores de las defensas de las plantas y que tienen un efecto antifúngico directo sobre algunos patógenos (McDonald *et al.*, 2001).

Según Guest y Bompeix (1990), los Phi poseen tanto un efecto directo como indirecto al actuar como biopesticidas en las plantas. Los efectos directos que se han podido observar en Oomycetes incluyen: inhibición del crecimiento del micelio, cambios en la composición de la superficie micelial, entre otros (Guest y Bompeix, 1990; Guest y Grant, 1991). También existe evidencia de dicha acción antifúngica directa sobre algunos patógenos no pertenecientes al orden de los Oomycetes en el cultivo de papa, como *Streptomyces scabies* (Lambert y Loria), *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* (Lobato *et al.*, 2010). Los efectos indirectos causados por los Phi, tienen que ver con la activación de las respuestas de defensa en la planta (Guest y Bompeix 1990; Andreu, 2006; Lobato *et al.*, 2008).

Los Phi son los únicos compuestos químicos antifúngicos sistémicos de rápida absorción que además de moverse por el xilema, lo hacen a través del floema (Reis *et al.*, 2010). Esto posibilita la translocación de los mismos desde las hojas hasta las raíces. Contar con una alternativa química complementaria de enfermedades de raíz y tallo mediante pulverizaciones foliares (Ravotti *et al.*, 2012; Ravotti, 2012) resultaría esencial para el control de patógenos habitantes de suelo, tales como *M. phaseolina*.

En nuestro país, se han llevado a cabo estudios con importantes resultados sobre estos compuestos en relación al manejo de enfermedades de fin de ciclo (EFC) en soja (Carmona y Sautua, 2011). Entre los años 2005 a 2014, experimentos realizados con Phi demostraron que su uso reduce la severidad de las EFC aumentando el rendimiento entre 2,1 a 2,7 qq/ha (Carmona *et al.*, 2006; Tula, 2013; Kistner, 2013; Ibarra, 2014).

Resultados similares fueron obtenidos al utilizar Phi Mn en combinación con bacterias PGPR como tratamiento de semillas de soja para el control de la podredumbre carbonosa (Simonetti *et al.*, 2015). Sin embargo, el potencial uso de estos compuestos fitoestimulantes como práctica de manejo, aún no ha sido del todo explorado.

1.1.5- Contexto actual

El avance de la frontera agrícola junto con la adopción masiva del paquete tecnológico: soja RR, glifosato y siembra directa, han llevado a un aumento del uso de dicho herbicida (Díaz Rönnner, 2005). Adicionalmente, el bajo precio del glifosato, sumado a la aparición de casos de resistencia al mismo, han hecho que actualmente se apliquen dosis mucho mayores a las recomendadas y/o en varios momentos fenológicos del cultivo (Benbrook, 2012). En este contexto, se vuelve interesante estudiar el impacto que el herbicida glifosato pueda tener sobre la susceptibilidad de la soja RR a enfermedades de importancia económica tales como la podredumbre carbonosa.

En este sentido, resulta relevante investigar si siendo los Phi compuestos fitoestimulantes; su aplicación podría contrarrestar la vulnerabilidad supuestamente generada por el glifosato en el cultivo de soja al ataque de *M. phaseolina*.

De acuerdo con la bibliografía nacional e internacional consultada, no existen antecedentes relacionados con el uso de Phi Mn como alternativa de manejo para *M. phaseolina* en soja RR y como contraposición a la supuesta reducción de las defensas por parte del glifosato.

En la actualidad, existe un incremento en la aplicación de productos químicos para el manejo de adversidades fitosanitarias. Por este motivo, es importante investigar alternativas de control de enfermedades de baja toxicidad que aseguren los rendimientos del cultivo y sean amigables con el medio ambiente, contribuyendo a la sustentabilidad del agrosistema. Dentro de estas alternativas de manejo, el uso de inductores de la resistencia o bioestimulantes tales como los Phi, podría constituir una valiosa estrategia. También resulta de interés definir el rol del glifosato en el desarrollo de enfermedades radiculares y las alternativas para contrarrestar su impacto.

1.2- OBJETIVOS

1.2.1- Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue estudiar las implicancias de la aplicación de Phi Mn, glifosato y la mezcla de ambos compuestos, sobre la predisposición a enfermedades y cambios en los parámetros del estrés oxidativo y de las defensas enzimáticas para la podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina*, en plantas de soja RR.

1.2.2- Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto *in vitro* de distintas concentraciones de glifosato, Phi Mn y glifosato + Phi Mn, sobre el crecimiento micelial y microesclerocios de *M. phaseolina*.
- 2) Estudiar el efecto de la aplicación de glifosato, Phi Mn y la mezcla de glifosato con Phi Mn sobre la severidad radicular de la podredumbre carbonosa, en plantas de soja RR.

3) Analizar el efecto de la aplicación del Phi Mn, glifosato y la mezcla de glifosato con Phi Mn sobre los cambios producidos en el estado oxidativo, y en las enzimas antioxidantes y de defensa en soja RR inoculada con *M. phaseolina*.

1.3- HIPÓTESIS

- 1) El glifosato en aplicaciones directas *in vitro* no afecta el crecimiento micelial de *M. phaseolina*, ni sus microesclerocios.
- 2) Las concentraciones crecientes de Phi Mn *in vitro* impactan negativamente en el crecimiento y en los microesclerocios de *M. phaseolina*.
- 3) La aplicación de glifosato en conjunto con Phi Mn genera un impacto negativo sobre el crecimiento micelial y los microesclerocios de *M. phaseolina*.
- 4) La aplicación de glifosato *in vivo* provoca un aumento en la severidad de la podredumbre carbonosa.
- 5) La aplicación de Phi Mn sólo, reduce la severidad de la enfermedad en las raíces.
- 6) La mezcla de glifosato con Phi Mn genera una reducción de la severidad de la enfermedad comparada con aquellas plantas enfermas tratadas con glifosato.
- 7) La aplicación de glifosato sobre plantas de soja RR, disminuye la actividad de las enzimas relacionadas con las defensas. Asimismo, es probable que se observe un aumento de los parámetros relacionados con el estrés.
- 8) El Phi Mn reduce el estrés oxidativo de las células de la planta y estimula la actividad de ciertas enzimas de defensa, en especial aquellas que provengan de rutas metabólicas reguladas por Mn.
- 9) La aplicación de glifosato en conjunto con el Phi Mn disminuye los parámetros relacionados con el estrés oxidativo e incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa de la planta, en comparación con el tratamiento de glifosato sólo.

Capítulo II:

Efectos del fosfito de manganeso y del glifosato sobre el desarrollo micelial y estructuras de resistencia de *M. phaseolina* en experimentos *in vitro*

2.1- INTRODUCCIÓN

La toxicidad de una molécula frente a un determinado patógeno, se mide mediante parámetros tales como la CI_{50} (concentración que inhibe el 50% del crecimiento micelial y germinación de esporas) (Sharvelle, 1961; Torgeson, 1967; Edgington *et al.*, 1971; Reis *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2015). La CI_{50} es específica y constante para un agente químico particular y para un patógeno determinado. Un valor de CI_{50} bajo representa una alta acción fungicida (“potencia” fungicida), con una baja concentración de sustancia química (Reis *et al.*, 2010; Tonin *et al.*, 2013).

Según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Comitee, FRAC 2014; <http://www.frac.info/resistance-overview>), el monitoreo de la sensibilidad de un hongo al fungicida es importante para maximizar su eficiencia de control. En el caso de *M. phaseolina*, también cobra relevancia el efecto que las sustancias fungitóxicas puedan tener sobre su principal fuente de inóculo: los microesclerocios.

Las paredes externas de los microesclerocios de *M. phaseolina* están formadas por un conjunto de hifas entrelazadas, las cuales presentan gruesas paredes celulares que las hacen especialmente resistentes a la desecación. Esta capa posee una coloración oscura debido a la acumulación de melanina en las paredes de las hifas externas (Espinosa de los Monteros, 2006). Estos pigmentos no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo del patógeno, pero mejoran la supervivencia y las habilidades competitivas de las especies en ciertos ambientes (Bell y Wheeler, 1986).

Si bien los Phi han demostrado generar efectos perjudiciales en los patógenos tales como la inhibición del crecimiento micelial, cambios metabólicos, supresión de la germinación y esporulación (Cohen y Coffey, 1986; Garbelotto *et al.*, 2009); no existen reportes de su impacto sobre estructuras de resistencia como los esclerocios.

En el caso del glifosato, la mayor parte de los estudios que examinan el efecto de este herbicida sobre el desarrollo de las enfermedades de la soja se han llevado a cabo a campo y en invernáculo (Anderson y Kolmer, 2005; Feng *et al.*, 2005).

Algo similar ocurre con la combinación de glifosato y Phi Mn. Las pocas investigaciones efectuadas sobre esta mezcla se centran en los problemas de fitotoxicidad y el rendimiento de los cultivos a campo (Ferraris y Couretot, 2012; Gomes *et al.*, 2013) y no evalúan su toxicidad frente a patógenos *in vitro*.

Edgington *et al.* (1971) propusieron el siguiente criterio para clasificar una sustancia fungicida de acuerdo a su fungitoxicidad: aquellas sustancias que presentan una CI_{50} menor a 1 son altamente fungitóxicas; aquellos compuestos que poseen una CI_{50} entre 1 y 50 ppm son moderadamente fungitóxicos; y, finalmente, las sustancias cuya CI_{50} es mayor a 50 ppm resultan no tóxicas (Tonin *et al.*, 2013).

En este capítulo, se examinó el efecto directo que poseen el glifosato, el Phi Mn y el glifosato + Phi Mn sobre el crecimiento y desarrollo del hongo *M. phaseolina in vitro*, y su impacto sobre sus estructuras de supervivencia. De esta manera, se cumple con el objetivo específico 1.

2.2- MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo tres experiencias *in vitro* en el laboratorio de la Cátedra de fitopatología de la Facultad de Agronomía (UBA). La metodología utilizada fue una adaptación de la aplicada por Ravotti (2012) y Ravotti *et al.* (2012).

En un primer experimento, se utilizaron concentraciones variables del producto “UltraMn” (P₂O₅: 40%, ver apéndice) comercializado por Spraytec S.R.L.

Los tratamientos consistieron en distintas concentraciones de Phi en medio de cultivo agar papa glucosado (APG):

- Control (0 ppm de PhiMn – sólo APG)
- 100 ppm de Phi Mn
- 200 ppm de Phi Mn
- 300 ppm de Phi Mn
- 400 ppm de Phi Mn
- 500 ppm de Phi Mn
- 800 ppm de Phi Mn
- 1000 ppm de Phi Mn

Primeramente, se confeccionó una dilución 1:10 del producto que contiene Phi Mn. Luego, en cámara de flujo, se esterilizó esta solución mediante un filtro para jeringa estéril de 0,20 µm. Más tarde, se colocaron 22 ml de APG en placas de petri estériles y con una micropipeta se agregó la solución del fitoestimulante. Una vez solidificado el medio de cultivo con el formulado, se sembró un disco de agar de 6 mm del patógeno *M. phaseolina* en cada una de las placas. Se utilizó un aislamiento de *M. phaseolina* obtenido a partir de plantas de soja infectadas provenientes de la región pampeana, que mostraban síntomas típicos de la enfermedad. El aislamiento se realizó según técnicas fitopatológicas de rutina.

Se confeccionaron 3 cajas de petri (réplicas) por tratamiento. Las placas inoculadas se incubaron en oscuridad en cámara de cultivo a 28°C. El crecimiento en diámetro del hongo se registró 4 días después de incubación (Ravotti, 2012; Ravotti *et al.*, 2012). Finalizado ese tiempo, se midió el diámetro micelial del patógeno. Además, se registraron los cambios de coloración y morfología de los microesclerocios mediante fotografías en microscopio. Para distinguir las diferencias en la coloración se utilizó el sistema de zonas propuesto por Adams y Baker (1981). Este método se basa en una escala que abarca los tonos existentes entre el blanco y el negro. Lo que se hace es dividir ese espectro en una serie de zonas más fáciles de distinguir por el ojo humano (Fig. 2.1). La distancia de una zona a otra representa un paso en el tiempo de exposición a la luz (Adams y Baker, 1981).

Zona	
0	Negro puro
I	Negro, con leve tonalidad pero sin textura
II	Negro con textura
III	Gris oscuro con poca textura
IV	Gris oscuro con textura
V	Gris medio
VI	Gris claro, medio texturizado
VII	Gris claro
VIII	Blanco con textura
IX	Blanco sin textura
X	Blanco puro

Figura 2.1 Sistema de zonas de la escala de grises (Adams y Baker, 1981) utilizado para determinar las diferencias de coloración en los microesclerocios de *M. phaseolina* para los distintos tratamientos. La escala divide las tonalidades entre el blanco y el negro en zonas fáciles de distinguir por el ojo humano.

La escala también divide a las tonalidades entre el blanco y el negro, en grupos (Fig. 2.1) (Adams y Baker, 1981):

- Grupo de valores bajos: zonas 0 – I – II – III
- Grupo de valores medios: zonas IV – V – VI
- Grupo de valores altos: zonas VII – VIII – IX – X

Por otro lado, se probó el impacto del glifosato sobre el patógeno. Se utilizaron diferentes concentraciones de glifosato, equivalente ácido 48%, cuya composición se detalla en el apéndice.

Los tratamientos consistieron en:

- Control (0 ppm i.a. glifosato)
- 20 ppm i.a. glifosato
- 60 ppm i.a. glifosato
- 100 ppm i.a. glifosato
- 140 ppm i.a. glifosato

- 280 ppm i.a glifosato
- 560 ppm i.a glifosato
- 1120 ppm i.a. glifosato

de acuerdo a Conde (2011) y a experimentos preliminares. Se trabajó con una solución madre de glifosato en agua destilada (ver apéndice) y se utilizó la metodología descrita anteriormente.

También se probaron diferentes concentraciones de glifosato en mezcla con Phi Mn. Para ello se preparó una solución madre de la mezcla, consistente en 188 µl de Phi Mn y 2,34 ml de glifosato en 50 ml de agua destilada. Las dosis de la mezcla fueron:

- 20 ppm
- 60 ppm
- 100 ppm
- 200 ppm
- 300 ppm
- 400 ppm
- 500 ppm
- 800 ppm
- 1000 ppm

En este caso, al igual que en los anteriores, se hicieron 3 réplicas (cajas de petri) de cada tratamiento.

Todos los experimentos se repitieron 2 veces.

Finalmente, se calculó la CI_{50} y 95 CI_{95} para el Phi Mn, para el glifosato y para la mezcla de ambos. Los resultados se analizaron mediante regresiones no lineales del porcentaje de control del hongo en función de las dosis de los distintos activos probados. Se utilizó un modelo logístico. Luego, las CI de los distintos ingredientes activos se compararon mediante t de student ($\alpha=0,05$).

2.3- RESULTADOS

El Phi Mn presentó la menor CI_{50} (Fig. 2.2), distinguiéndose significativamente del tratamiento mezcla glifosato + Phi Mn pero no del tratamiento con glifosato. En la Figura 2.3 se puede observar el impacto del Phi Mn sobre el desarrollo del patógeno.

El tratamiento de glifosato se ubicó en un estrato intermedio, con una CI_{50} de 379 ppm (Fig. 2.2) y no mostró diferencias con los demás tratamientos. El efecto del glifosato sobre el hongo *in vitro* está representado en la Figura 2.4.

Finalmente, la mezcla de glifosato + Phi Mn fue menos efectiva que el Phi Mn ($p<0,05$) para el control de *M. phaseolina* (Fig. 2.2; Fig. 2.5).

Con respecto a la CI₉₅, la tendencia se mantuvo, pero no se observaron diferencias estadísticamente relevantes entre tratamientos (Fig. 2.2).

De acuerdo a los resultados obtenidos y según la clasificación de Edgington *et al.* (1971), surge que los tratamientos probados no son tóxicos para *M. phaseolina*.

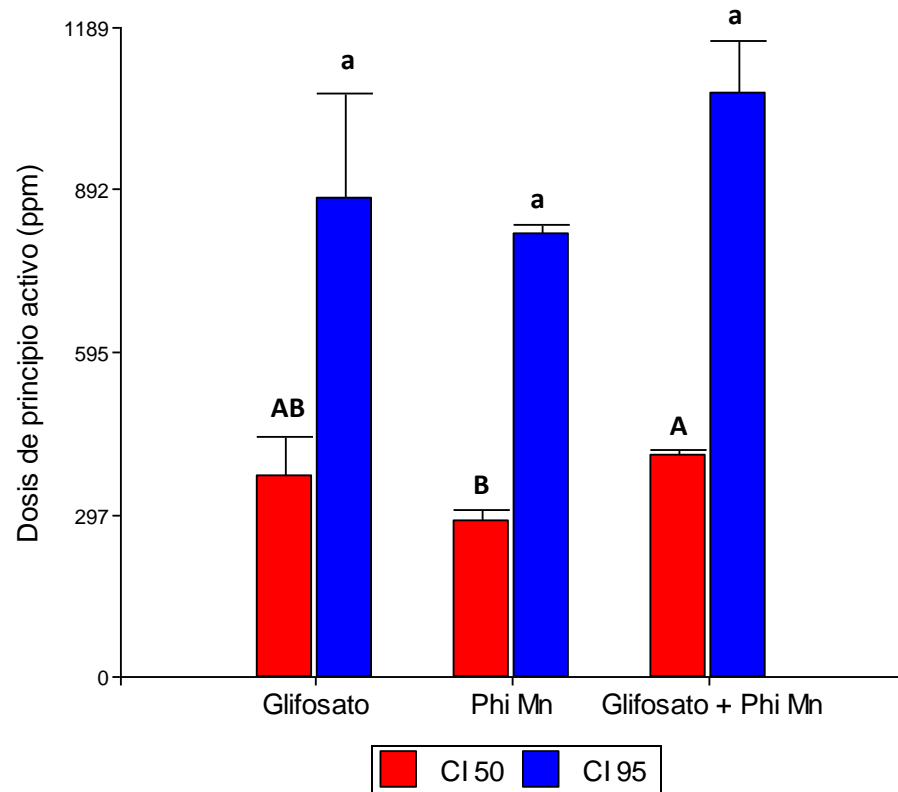


Figura 2.2 Concentración inhibitoria 50 (CI50) y concentración inhibitoria 95 (CI95) promedio de *M. phaseolina* para los tratamientos glifosato, Phi Mn y glifosato + Phi Mn. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Letras mayúsculas: CI50; letras minúsculas: CI95.

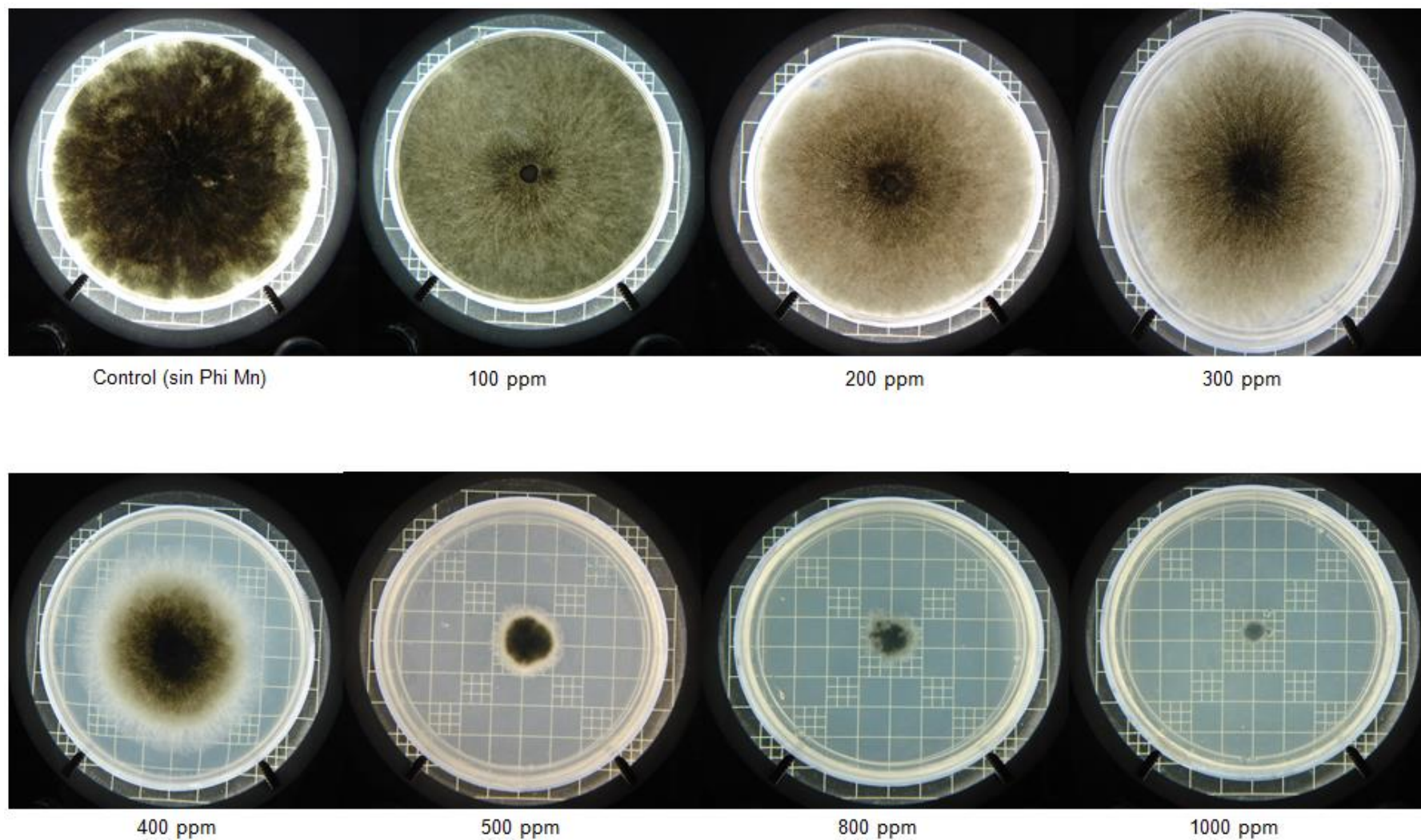


Figura 2.3 Desarrollo *in vitro* del patógeno *M. phaseolina* en medio de cultivo APG mezclado con distintas concentraciones de Phi Mn (ppm), al 4to día de incubación en oscuridad a 28°C.

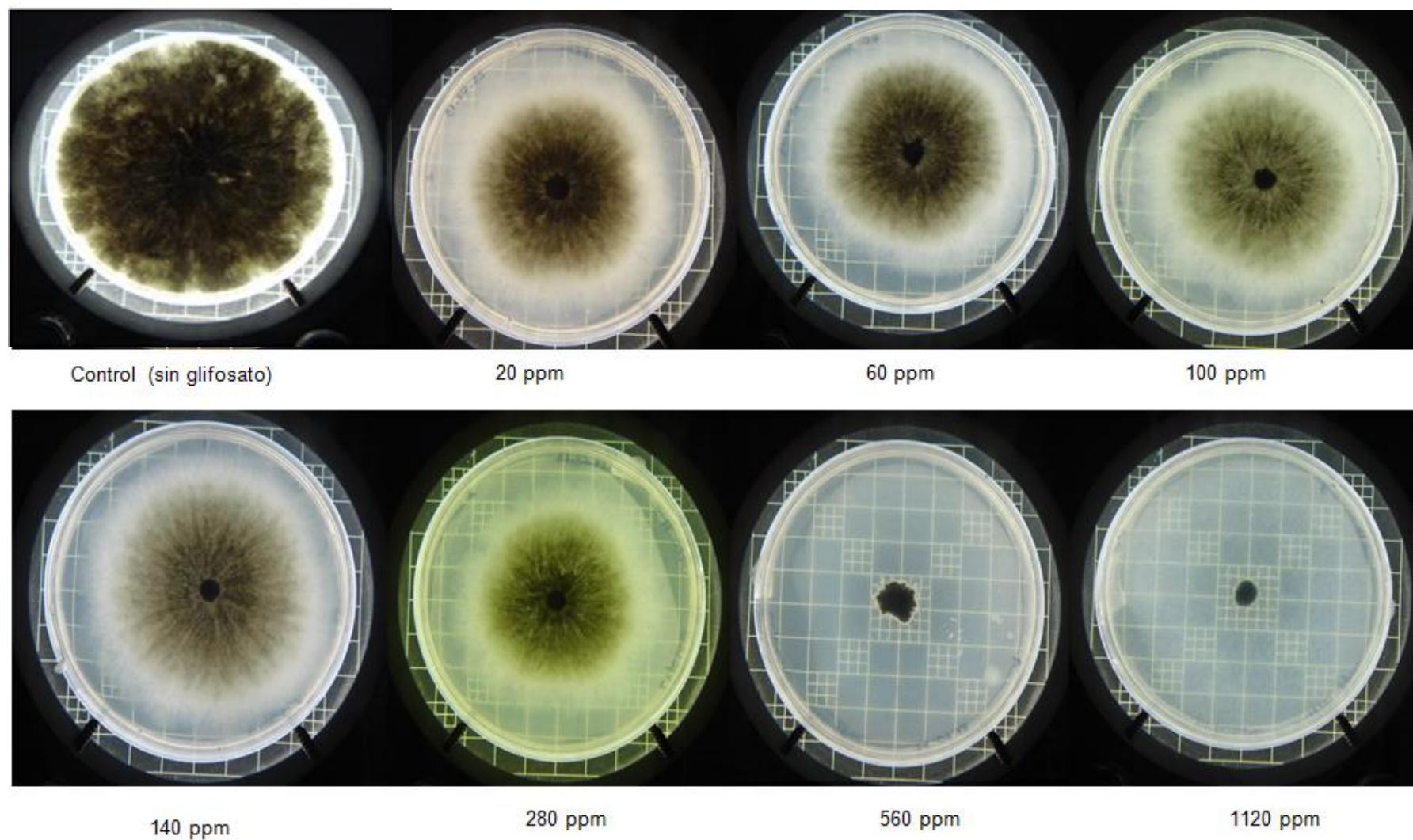


Figura 2.4 Desarrollo *in vitro* del patógeno *M. phaseolina* en medio de cultivo APG mezclado con distintas concentraciones de glifosato (ppm), al 4to día de incubación en oscuridad a 28°C.

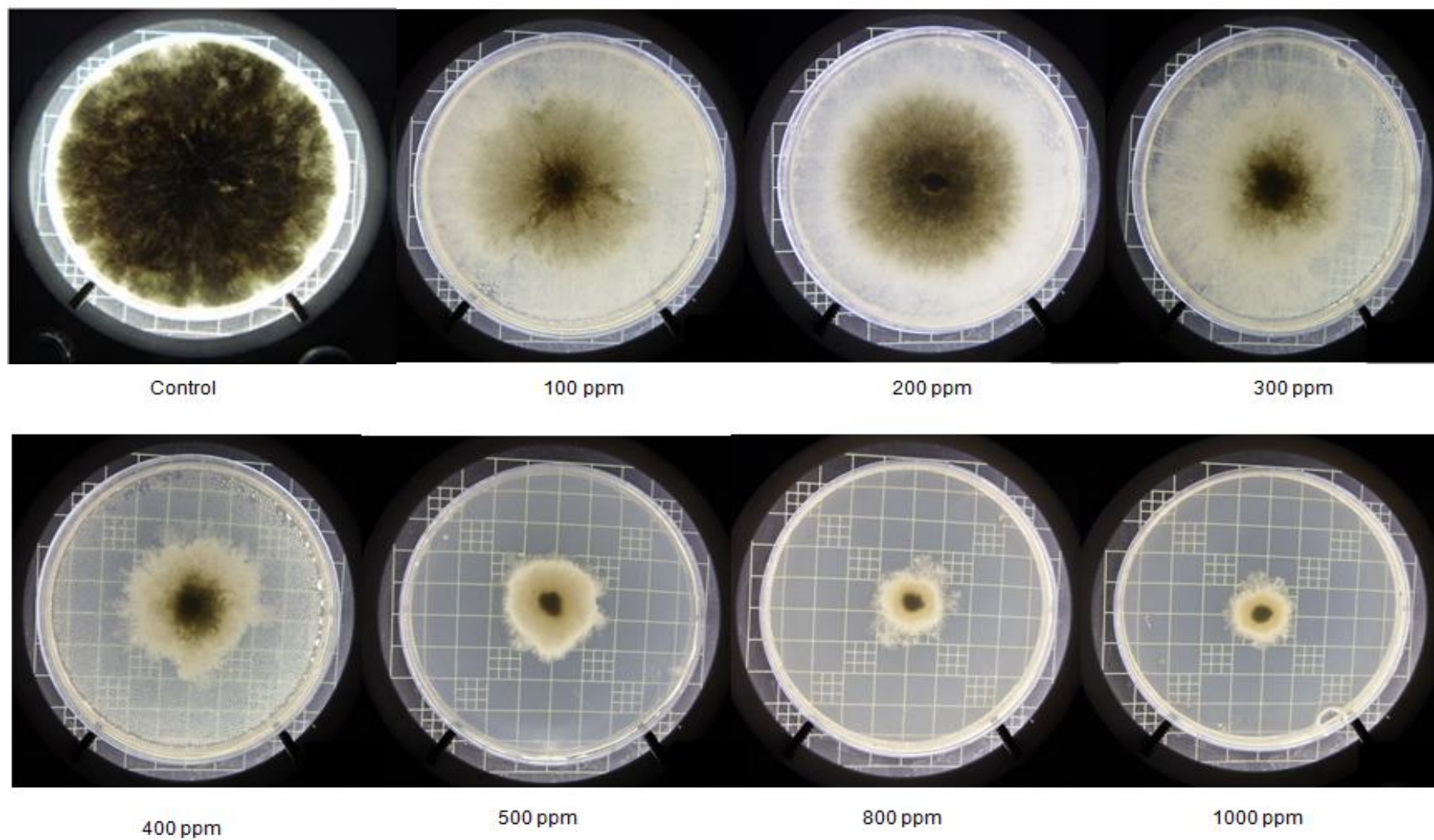


Figura 2.5 Desarrollo *in vitro* del patógeno *M. phaseolina* en medio de cultivo APG mezclado con distintas concentraciones de glifosato + Phi Mn (ppm), al 4to día de incubación en oscuridad a 28°C.

A pesar de lo observado para las CI_{50} , al analizar el efecto de los ingredientes activos sobre las estructuras de resistencia del patógeno, la tendencia percibida anteriormente entre los tratamientos, se modifica.

La mezcla de glifosato + Phi Mn a tan sólo 100 ppm pareciera haber generado una pérdida de melanina, ya que los esclerocios se aprecian más claros en comparación con los demás tratamientos (Fig. 2.6 y 2.7, (D)). De acuerdo al sistema de zonas (Adams y Baker, 1981) (Fig. 2.1) los microesclerocios de la fotografía testigo (Fig. 2.6 y 2.7, (A)) presentaron una tonalidad que coincide con la zona I (cercano a negro) (Fig. 2.1). Por otro lado, los microesclerocios tratados con la mezcla de glifosato + Phi Mn (Fig. 2.6 y 2.7, (D)) se situaron en la zona V (gris intermedio) (Fig. 2.1). Por lo tanto, el tratamiento testigo se ubicó, de acuerdo a Adams y Baker (1981), dentro del “grupo de valores bajos” (zonas 0, I, II y III) y la mezcla de glifosato + Phi Mn en el “grupo de valores medios” (zonas IV, V y VI). Esto significa que hubo una diferencia sustancial en la coloración de las estructuras de resistencia entre los tratamientos mencionados.

Los microesclerocios del patógeno provenientes del tratamiento con glifosato (Fig. 2.6 y 2.7, (B)) presentaron una coloración correspondiente a la zona II (Fig. 2.1), mientras que aquellos tratados con Phi Mn sólo (Fig. 2.6 y 2.7, (C)), se adecuaron a la zona III (Fig. 2.1). No obstante, estos dos tratamientos, se encuentran en el mismo grupo de tonalidades que el tratamiento testigo “valores bajos”. El único tratamiento que se diferenció del resto en forma relevante fue la combinación de glifosato + Phi Mn, que se ubicó en otro grupo (“valores medios”).

A una dosis de 300 ppm, el tratamiento Phi Mn también comenzó a generar una pérdida de melanina en los microesclerocios (Fig. 2.8, (C)), ubicándose en la zona IV, “gris oscuro con textura” (Fig. 2.1) (Adams y Baker, 1981). Mientras que el tratamiento de glifosato + Phi Mn presentó esclerocios aún más claros que a una dosis de 100 ppm (Fig. 2.8 (D)), con una tonalidad cercana a la zona VI “gris claro medio texturizado” (Fig. 2.1). El glifosato se mantuvo en la zona II para esta dosis, sin observarse cambios en las estructuras de resistencia del patógeno (Fig. 2.8 (B)).

De esta manera, a 300 ppm, los tratamientos testigo y glifosato quedaron situados en el “grupo de valores bajos” (zonas 0, I, II y III) y el Phi Mn y la mezcla de glifosato + Phi Mn en el “grupo de valores intermedios” (zonas IV, V y VI). Es decir que, al aumentar la dosis, el Phi Mn tiende a separarse del testigo y del glifosato y a parecerse más al efecto de la mezcla, aunque la diferencia entre éstos últimos es muy notable.

A 500 ppm prácticamente no hay formación de microesclerocios para los tratamientos Phi Mn y glifosato (por separado). Para la mezcla, a partir de las 400 ppm la formación de microesclerocios fue despreciable.

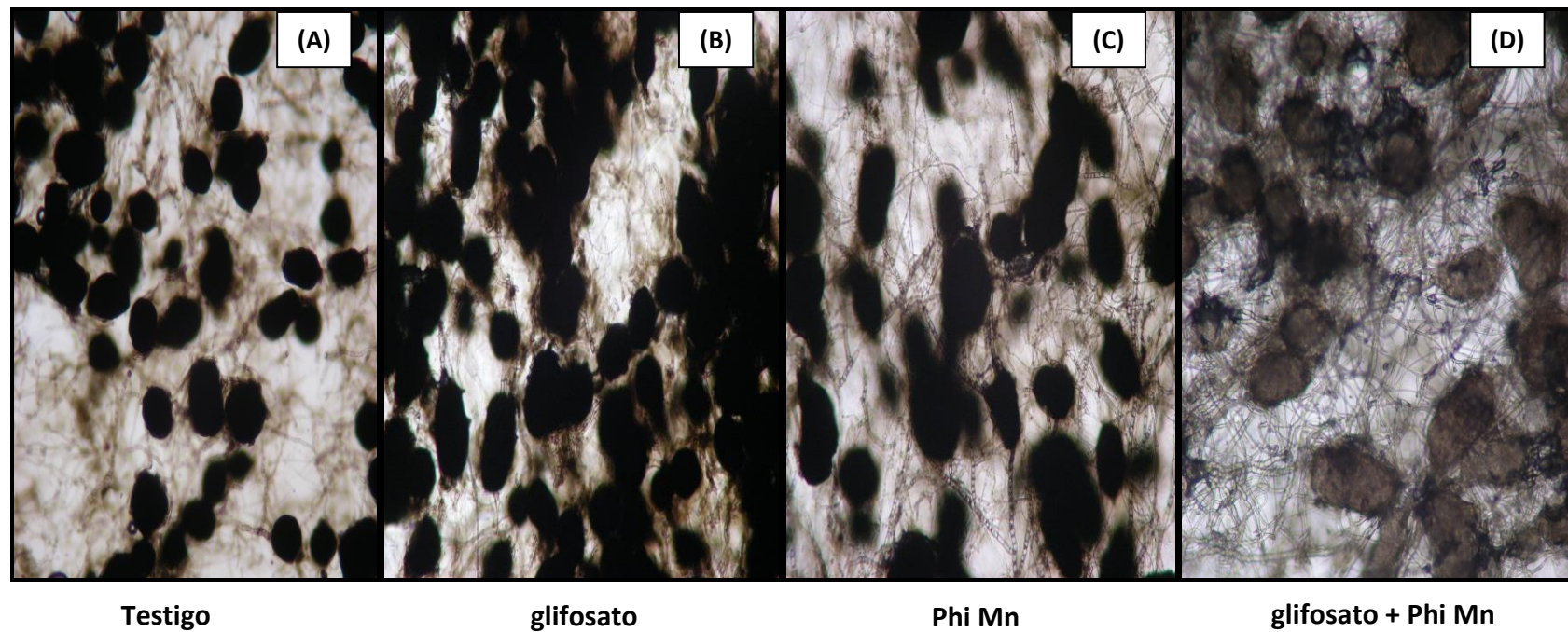


Figura 2.6 Microesclerocios de *M. phaseolina* creciendo en medio de cultivo APG sólo (A) y con 100 ppm de: glifosato (B), Phi Mn (C) o glifosato + Phi Mn (D). Fotografías tomadas en microscopio óptico a 10X, luego de 4 días de incubación en oscuridad a 28°C.

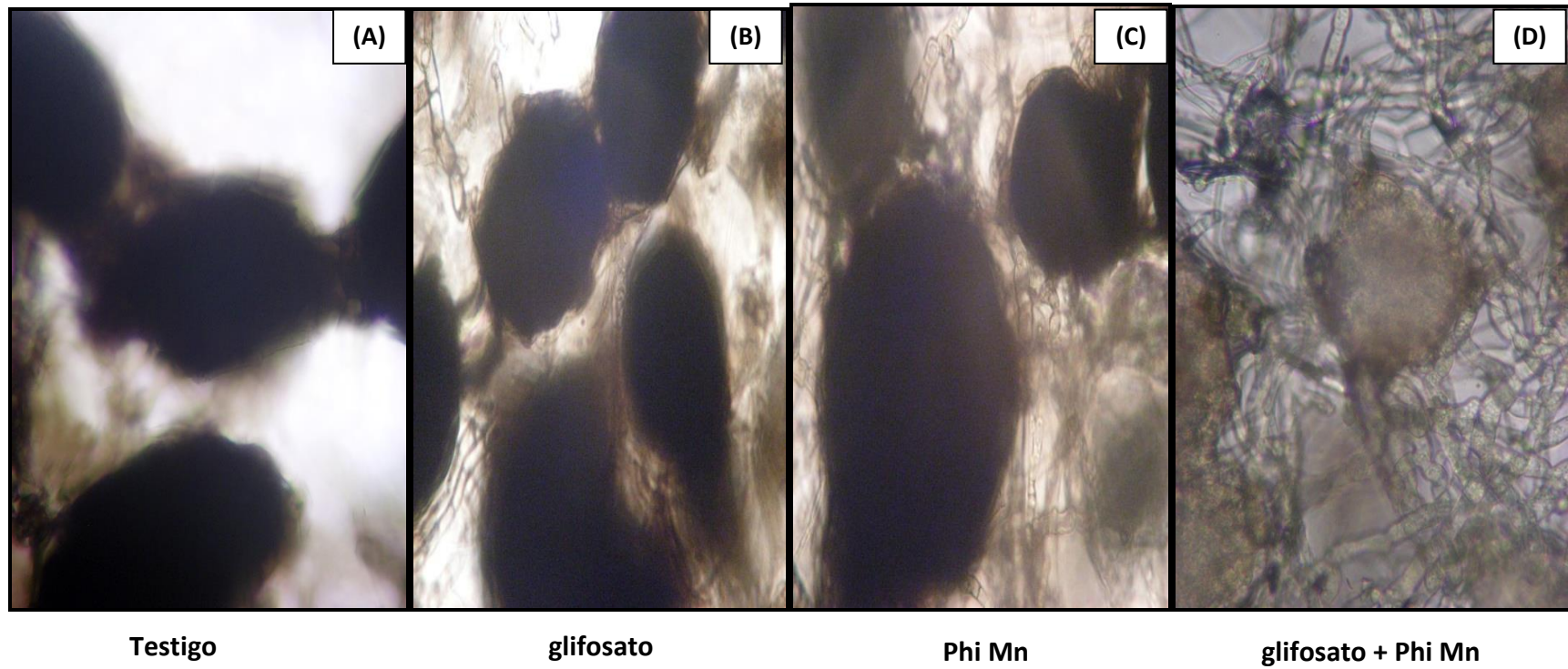


Figura 2.7 Microesclerocios de *M. phaseolina* creciendo en medio de cultivo APG sólo (A) y con 100 ppm de: glifosato (B), Phi Mn (C) y glifosato + Phi Mn (D). Fotografías tomadas en microscopio óptico a 40X, luego de 4 días de incubación en oscuridad a 28°C.

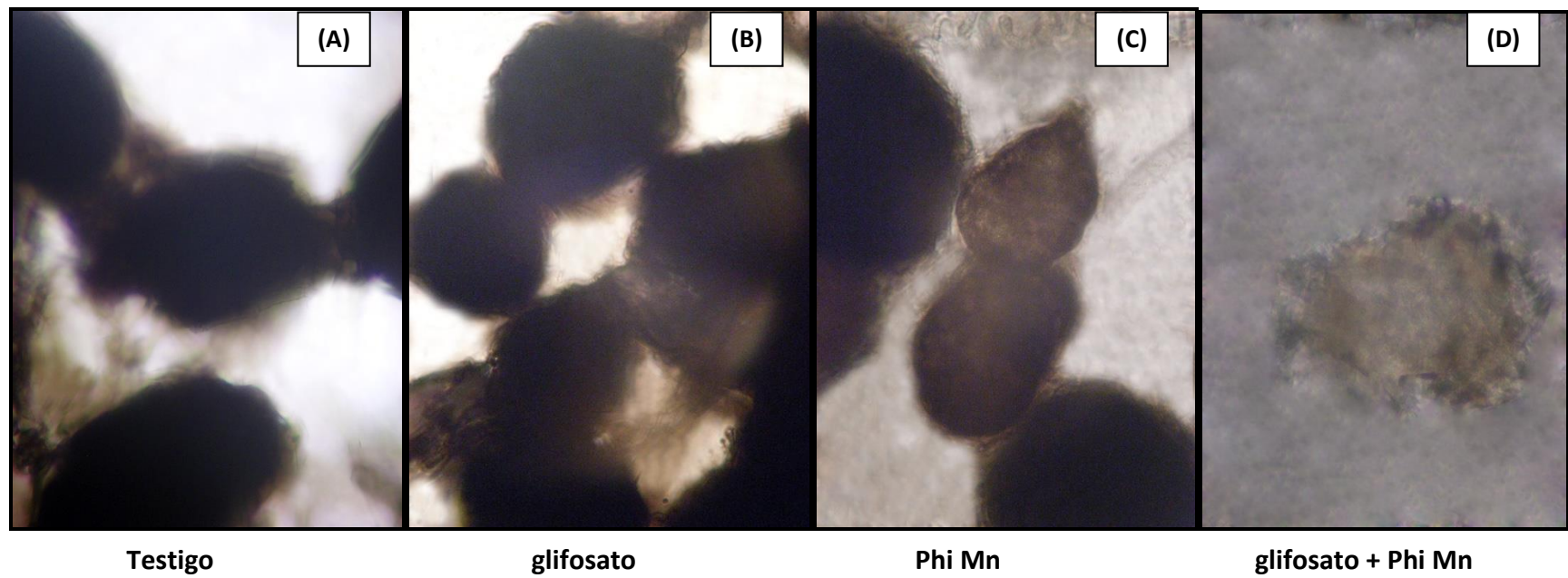


Figura 2.8 Microesclerocios de *M. phaseolina* creciendo en medio de cultivo APG sólo (A) y con 300 ppm de: glifosato (B), Phi Mn (C) y glifosato + Phi Mn (D). Fotografías tomadas en microscopio óptico a 40X, luego de 4 días de incubación en oscuridad a 28°C.

2.4- DISCUSIÓN

Las alteraciones en el desarrollo de *M. phaseolina in vitro* observadas para el tratamiento de glifosato sólo, coinciden con lo informado por Mengistu *et al.* (2013). Sin embargo, no existen antecedentes de los efectos del herbicida sobre los microesclerocios del patógeno. En esta tesis, los cambios observados en la coloración de las estructuras de resistencia del hongo sometido al herbicida fueron mínimos con respecto al testigo (Zona II vs Zona I, Adams y Baker, 1981). En consecuencia, se rechaza la primera parte de la hipótesis 1 (el glifosato en aplicaciones directas *in vitro* no afecta el crecimiento micelial de *M. phaseolina*) y se acepta la segunda parte (el glifosato no afecta los microesclerocios del hongo).

El Phi Mn presentó el mayor efecto fungitóxico, con la menor CI₅₀ para el patógeno en estudio. Lo que sería un indicio de que estos compuestos no sólo presentan efectos Oomyceticidas, sino también fungicidas. Lobato *et al.* (2010) también encontraron efectos perjudiciales de los Phi en hongos verdaderos en papa.

Si bien, de acuerdo a la clasificación descripta por Edgington *et al.* (1971) y a las CI₅₀ obtenidas en este experimento, el glifosato, el Phi Mn y la mezcla de ambos no resultan tóxicos para *M. phaseolina*; es preciso destacar que dicha clasificación fue creada para sustancias netamente fungicidas. En este caso se pusieron a prueba otro tipo de compuestos, fitoestimulantes y herbicidas, por lo que la clasificación resulta sólo orientativa.

El tratamiento de Phi Mn, además, generó cambios en la conformación de las estructuras de resistencia del patógeno. A una dosis de 300 ppm, los microesclerocios se observaron más claros que los del tratamiento testigo (zona IV vs zona I, Adams y Baker, 1981), incluso difiriendo entre grupos de tonalidades (“grupo de valores medios” vs “grupos de valores bajos” para Phi Mn y testigo, respectivamente). Así es que, se acepta la hipótesis 2 propuesta al comienzo de este trabajo (las concentraciones crecientes del Phi Mn en medio de cultivo *in vitro*, impactan negativamente en el crecimiento y en los microesclerocios de *M. phaseolina*).

El cambio de coloración, probablemente se deba a la degradación o inhibición de la síntesis de melanina. Los mecanismos mediante los cuales el Phi Mn podría generar esta pérdida de melanina no están claros, y deberían realizarse nuevos estudios cuyos objetivos estén dirigidos a analizarlo en profundidad. La importancia de la melanina para la supervivencia y longevidad de los propágulos fúngicos ha sido reconocida desde hace muchos años (Bell y Wheeler, 1986). Es por ello que el efecto sobre el pigmento encontrado en este caso, podría significar la reducción de la viabilidad de los esclerocios. Dubey *et al.* (2012) reportaron que la pérdida de pigmento en microesclerocios e hifas de *M. phaseolina*, en conjunto con otras anormalidades morfológicas, causaron una pérdida de viabilidad del patógeno.

En lo que respecta al tratamiento mezcla de glifosato + Phi Mn, éste fue el que presentó la mayor CI₅₀. Si bien generó un perjuicio en el desarrollo micelial del patógeno, su fungitoxicidad fue menor que la del glifosato y la del Phi Mn evaluados por separado. Esto se mantuvo para la CI₉₅. No obstante, tuvo un efecto considerable en detrimento de los microesclerocios. Los cambios en la conformación y tonalidad de los mismos fueron notables a partir de las 100 ppm, la combinación de glifosato + Phi Mn fue el único tratamiento que se diferenció de los demás en cuanto a grupo de tonalidad (“grupo de valores medios” vs “grupo de valores bajos”), a dicha concentración. Por lo tanto, se acepta la hipótesis 3.

Butler *et al.* (2005) reportaron que la degradación o pérdida de melanina podría ser de importancia para reducir la acumulación de patógenos en el suelo si éstos poseen paredes celulares con melanina necesarias para sobrevivir. Se ha demostrado que el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. necesita producir melanina para formar estructuras de resistencia completamente funcionales (Klimes y Dobinson, 2006). Asimismo, Sheikh y Ghaffar (1979) observaron que el porcentaje de infección de *M. phaseolina* aumentaba linealmente con un incremento de la densidad de microesclerocios en el suelo. De esta manera, el tratamiento de glifosato + Phi Mn y, en menor medida, el tratamiento con Phi Mn sólo, podrían reducir el inóculo primario generado por los microesclerocios de *M. phaseolina*. Según Fogarty y Tobin (1996), el mecanismo de biosíntesis de melanina es un buen blanco para los agentes antifúngicos. Los esclerocios que han perdido la capacidad de generar melanina quedarían susceptibles a las condiciones adversas como el ataque de microorganismos benéficos, la luz UV, la desecación o inundación.

2.5- CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en este capítulo constituyen un importante avance preliminar para el control del patógeno *M. phaseolina*. La aplicación de glifosato en mezcla con Phi Mn, de glifosato o de Phi Mn sólo, ha demostrado afectar el crecimiento micelial del patógeno a altas concentraciones. De esta manera, resulta de destacada importancia llevar a cabo nuevos estudios que analicen la relación de las dosis *in vitro* aquí evaluadas y aquellas utilizadas normalmente a campo (Reis *et al.*, 2015).

Además, los tratamientos Phi Mn y glifosato + Phi Mn demostraron afectar drásticamente las estructuras de resistencia del patógeno. Esto podría contribuir a disminuir el inóculo primario del patógeno en aquellos lotes en los que estuviera instalado. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales dichos tratamientos producen los cambios observados en los esclerocios, no están claros. Por este motivo, serán necesarios nuevos estudios que se enfoquen directamente en la evaluación del impacto de estos tratamientos sobre la pérdida de melanina y viabilidad de los microesclerocios.

Esta es una investigación preliminar realizada *in vitro* para entender el efecto directo que el Phi Mn, el glifosato y la mezcla de ellos podrían ejercer sobre el desarrollo de *M. phaseolina*. En el próximo capítulo se presentan los efectos de estos compuestos sobre la planta y sobre la severidad de la enfermedad, bajo condiciones de invernáculo.

Capítulo III:

Impacto del glifosato y del fosfito de manganeso sobre la severidad de la podredumbre carbonosa (*M. phaseolina*) y variables agronómicas de interés en plantas de soja

3.1- INTRODUCCIÓN

Como ha sucedido con otros agroquímicos que lograron un uso generalizado, recientemente han surgido preocupaciones sobre las consecuencias resultantes del uso masivo del glifosato (Hartzler, 2010). Una de ellas es la relación entre la aplicación de este herbicida y la susceptibilidad a enfermedades en las plantas.

Varios autores afirman que el glifosato genera una disminución de las defensas naturales de las plantas a patógenos (Johal y Huber, 2009; Mijangos *et al.*, 2009; Bórtoli *et al.*, 2012). Nelson (1990) sostiene que el glifosato genera un incremento de la exudación radical en los cultivos RR, lo cual aumenta las infecciones radiculares causadas por patógenos de suelo. Se ha observado un aumento significativo de *Fusarium* spp. en el suelo, luego de dos semanas de aplicado el glifosato a dosis recomendadas de campo (Means, 2004). Similares resultados fueron obtenidos por Zaccaron (2013), quien observó un incremento de la incidencia del síndrome de muerte súbita (SDS), causado por *F. virguliforme* en determinados cultivares de soja RR, en invernáculo.

Además, se ha informado que el glifosato podría repercutir como un efecto cascada sobre organismos no blanco tales como los microorganismos benéficos, promoviendo, indirectamente, el desarrollo de enfermedades en las plantas (Helander *et al.*, 2012; Conde, 2011). También, la nodulación y la fijación de nitrógeno se vieron afectados en algunos cultivares de soja RR de principio de temporada aplicados con glifosato a dosis de campo (King *et al.*, 2001). Asimismo, se ha sugerido que el glifosato podría estimular la proliferación de patógenos indirectamente, ya que las malezas que mueren debido a la aplicación del herbicida sirven de fuente de energía para *Fusarium* spp. y *Pythium* spp., incrementando potencialmente el inóculo de ambos patógenos (Kawate *et al.*, 1992).

El potencial para desarrollar niveles de inóculo de patógeno críticos en los suelos, que afectan la sanidad de los cultivos, la alteración de las comunidades microbianas de la rizósfera involucradas en las transformaciones de nutrientes, y el cambio en el equilibrio de los microorganismos beneficiosos y perjudiciales para las plantas, son preocupaciones reales sobre el impacto del glifosato en la productividad de los cultivos y la sustentabilidad del medio ambiente (Kremer y Means, 2009).

Los Phi son conocidos por estimular la reducción de la severidad de enfermedades en las plantas (Guest y Grant, 1991; Lobato *et al.*, 2008). Además, aquellos Phi formulados con micronutrientes tales como el Mn, podrían compensar la menor disponibilidad de nutrientes generada por el glifosato, mejorando la resistencia de los cultivos (Huber, 2010; Ávila *et al.*, 2013).

Por otra parte, la alta solubilidad de los Phi y su capacidad de movilizarse tanto por el simplasto como por el apoplasto (Gisi *et al.*, 2002) los postula como potenciales herramientas para el manejo de patógenos de suelo.

Es por todo esto que en este capítulo se estudió el efecto del Phi Mn, el glifosato y la mezcla de ambos sobre plantas de soja inoculadas con *M. phaseolina*, registrando los cambios en la severidad radicular de la podredumbre carbonosa y teniendo en cuenta también algunas variables fisiológicas anexas. De esta manera, se cumple con el objetivo específico 2.

3.2- MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un experimento sobre plantas de soja cultivadas en macetas con el objetivo de cuantificar la severidad de la podredumbre carbonosa en las raíces de las mismas al final del ciclo. El experimento se desarrolló en los invernáculos de la Cátedra de fitopatología de la Facultad de Agronomía (UBA) y consistió en un DCA (diseño completamente aleatorizado) con un arreglo factorial de dos factores: glifosato y Phi Mn. Los niveles de los factores fueron los siguientes:

- glifosato (composición: ver apéndice):
 - 0 L/ha (sin aplicación de glifosato)
 - 2,5 L/ha aplicados en pre-siembra + 2,5 L/ha post-emergencia
- Phi Mn (composición: ver apéndice):
 - 0 L/ha (Sin aplicación de Phi Mn)
 - 0,2 L/ha (dosis comercial de Phi Mn)

En consecuencia, los tratamientos quedaron conformados del siguiente modo:

- Con inóculo de *M. phaseolina* (testigo inoculado)
- glifosato pre-siembra + glifosato post-emergencia, con inóculo de *M. phaseolina* (glifosato)
- Phi Mn con inóculo de *M. phaseolina* (Phi Mn)
- glifosato pre-siembra + glifosato post-emergencia + Phi Mn, con inóculo de *M. phaseolina* (glifosato + Phi Mn)

Se trabajó con sustrato profesional Growmix Multipro de Terraferil (ver apéndice). Dicho sustrato se mezcló con arena en una proporción 4:1, y, a su vez, se agregó arroz inoculado con *M. phaseolina* en una proporción de 1:10 conforme a experimentos previos. El inóculo sobre arroz se realizó de acuerdo a Pastor-Corrales y Abawi (1988) (ver apéndice). Se confeccionaron 6 macetas (repeticiones) por tratamiento.

Una vez homogeneizada la mezcla, se llenaron las macetas hasta la $\frac{3}{4}$ parte de su capacidad. Se regaron a saturación y luego, se incubaron durante 4 días a 30°C. Al cabo de este tiempo, se colocaron 9 semillas de la variedad de soja susceptible a *M. phaseolina*: A4990RG de la empresa Nidera; en cada una de las macetas y se cubrieron con una capa de sustrato. Se llevaron al invernáculo donde permanecieron durante todo el experimento. Luego de la emergencia de las plántulas, se realizó un raleo, dejando sólo una planta por maceta (Fig. 3.1). Las plantas se regaron con agua destilada y se mantuvieron al 50-80% de la capacidad de campo. Las macetas se rotaron diariamente para evitar efectos diferenciados debidos a la intensidad y calidad de luz. Con motivo de evitar problemas nutricionales, a los 30 días desde emergencia, se adicionó urea a todas las macetas en una solución de 0,5 g/L de agua



Figura 3.1 Experimento en plantas de soja inoculada con *M. phaseolina* y tratada con glifosato, Phi Mn y glifosato + Phi Mn en macetas en invernáculo, al cabo del cual se cuantificó la severidad de la podredumbre carbonosa en raíces.

Se empleó la misma formulación de glifosato que la utilizada en las experiencias *in vitro* (capítulo II), a una dosis de 2,5 L/ha en dos momentos de aplicación:

- Pre-siembra: 1 semana antes de la siembra
- Post-emergencia: 22 días después de la emergencia (Fig. 3.2)

Con respecto al Phi, éste se suministró alrededor de V4 (Fehr y Caviness, 1977), a 22 días post-emergencia y a una dosis de 0,2 L/ha, como fuera mencionado más arriba. Se utilizó el mismo producto que se usó en los experimentos *in vitro*, en el capítulo II (“Ultra Mn”, Spraytec S.R.L.).



Figura 3.2 Aplicación de glifosato a razón de 2,5 L/ha., 22 días post-emergencia de las plantas de soja (estado fenológico V4). El tratamiento de Phi Mn y el tratamiento mezcla de glifosato + Phi Mn se aplicaron de igual forma, a razón de 0,2 L/ha y 2,5 L/ha + 0,2 L/ha, respectivamente.

Al cabo de 60 días post-emergencia, aproximadamente en R4 (Fehr y Caviness, 1977) se cosecharon las plantas. Se registró la biomasa aérea, la biomasa radical y el número de vainas/planta con el fin de determinar si los tratamientos planteados generaban un impacto sobre ciertas variables fisiológicas de la soja.

Para cuantificar la severidad de la podredumbre carbonosa en raíces se utilizó el método de unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. phaseolina* por gramo de raíz. La técnica empleada se adaptó de Mengistu *et al.* (2007) y Reznikov *et al.* (2011). Se tomaron las raíces y la parte baja del tallo, se cortaron y se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de suelo (Fig. 3.3, (A)). Luego, se llevaron a secar en estufa a 40°C por 7 días para matar el micelio. Los tejidos secos se pasaron por un molinillo. Se tomaron 0.005 g de tejido molido (Fig. 3.3, (B)) y se colocaron en un tubo eppendorf conteniendo NaOCl al 3%, con el objetivo de desinfectar los tejidos molidos (Fig. 3.3, (C)). Se centrifugó por 3 min a 3.000 rpm. Más tarde, se desechó el sobrenadante del tubo eppendorf y se colocó agua destilada estéril con el objeto de enjuagar los tejidos radiculares molidos. Nuevamente, se llevó a centrifuga a 3.000 rpm durante 1 min. Este último paso, se repitió 3 veces. Finalmente, la suspensión de tejido molido se agregó a 5 ml de medio selectivo conteniendo: APG, rifampicina (100 mg/L) y metalaxyl (224 mg/L, sin tergitol) y se dispuso en placas de petri (Fig. 3.3, (D)). Se realizaron 5 placas por planta (sub-réplicas), 30 por tratamiento (Fig. 3.3, (E)). Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad por 3 días y la severidad de la enfermedad se contabilizó mediante UFC/g de raíz (Fig. 3.3, (F)). Esta unidad se calculó promediando las sub-réplicas y refiriendo las UFC a 1 g de raíz. Cada UFC proviene de un microesclerocio de *M. phaseolina* (Mengistu *et al.*, 2007). Los resultados se analizaron mediante ANOVA, con un $\alpha=0,05$ y test de comparación de medias DGC.

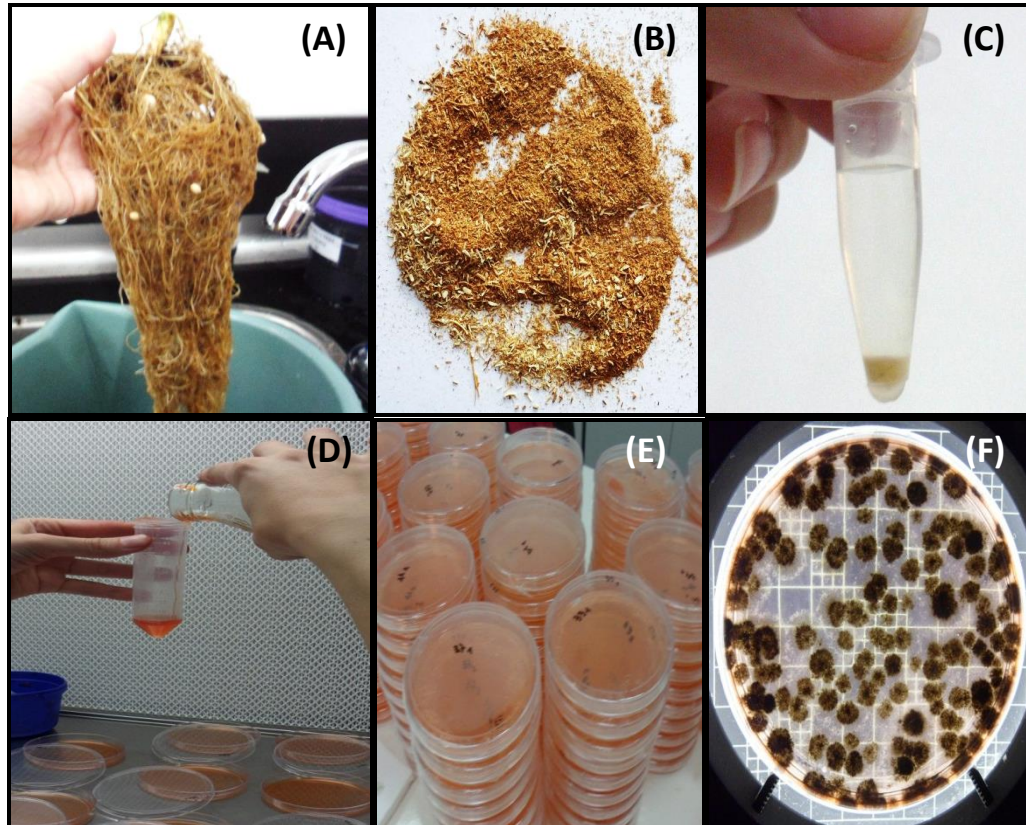


Figura 3.3 Proceso de realización de la técnica de medición de UFC/g raíz de soja. Lavado de raíces (A); raíces molidas (B); desinfección superficial del polvo de raíz en tubo eppendorf (C); sembrado de la suspensión de raíz en medio selectivo (D); placas de petri listas para incubar (E); UFC de *M. phaseolina*, después de 3 días de incubación a 28°C (F).

3.3- RESULTADOS

3.3.1- Severidad de la podredumbre carbonosa en raíces

La interacción entre los factores glifosato y Phi Mn (Fig. 3.4) resultó ser altamente significativa ($p=0,0180$). Los tratamientos de glifosato y Phi, por separado, presentaron 5415 y 4596 UFC/g raíz, respectivamente. Mientras que la mezcla de ambos productos redujo significativamente la severidad de la podredumbre carbonosa, con unas 2883 UFC/g raíz (Fig. 3.4).

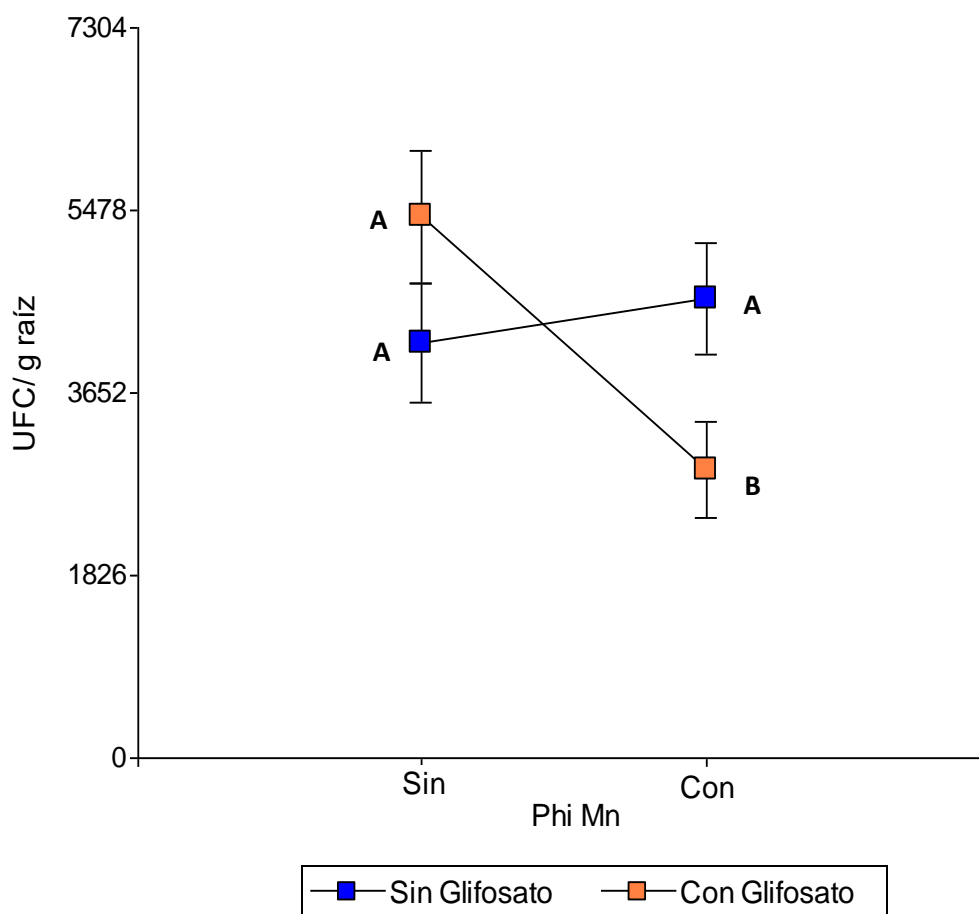


Figura 3.4 UFC de *M. phaseolina*/g raíz promedio en función de las combinaciones de los factores glifosato y Phi Mn, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre los puntos indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).

La reducción significativa de la podredumbre carbonosa por parte del tratamiento mezcla (glifosato + Phi Mn) se tradujo en un control del 30% con respecto al testigo inoculado (*M. phaseolina*) y del 47% con respecto a las plantas tratadas con glifosato (Tabla 3.1).

El glifosato solo presentó la máxima severidad entre los tratamientos analizados, con un incremento de más del 30% por encima del testigo inoculado (1264 UFC/g raíz más que el testigo). Sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Fig. 3.4).

Por otro lado, el Phi Mn, también presentó un ligero aumento de la severidad respecto del testigo inoculado (Fig. 3.4). Esto, sin embargo, no resultó ser significativo.

En la Figura 3.5, se observan las placas de petri más representativas con las UFC reales de *M. phaseolina*/0,005 g raíz para cada tratamiento.

Tratamiento	% Control vs Testigo	% Control vs glifosato
Testigo inoculado	-	23,34
glifosato	-	-
Phi Mn	-	15,12
glifosato + Phi Mn	30,5	46,76

Tabla 3.1 Porcentaje de control de la severidad de la podredumbre carbonosa en raíces de soja por cada tratamiento vs. el testigo inoculado (*M. phaseolina*) y vs. glifosato sólo, 37 días después de la aplicación

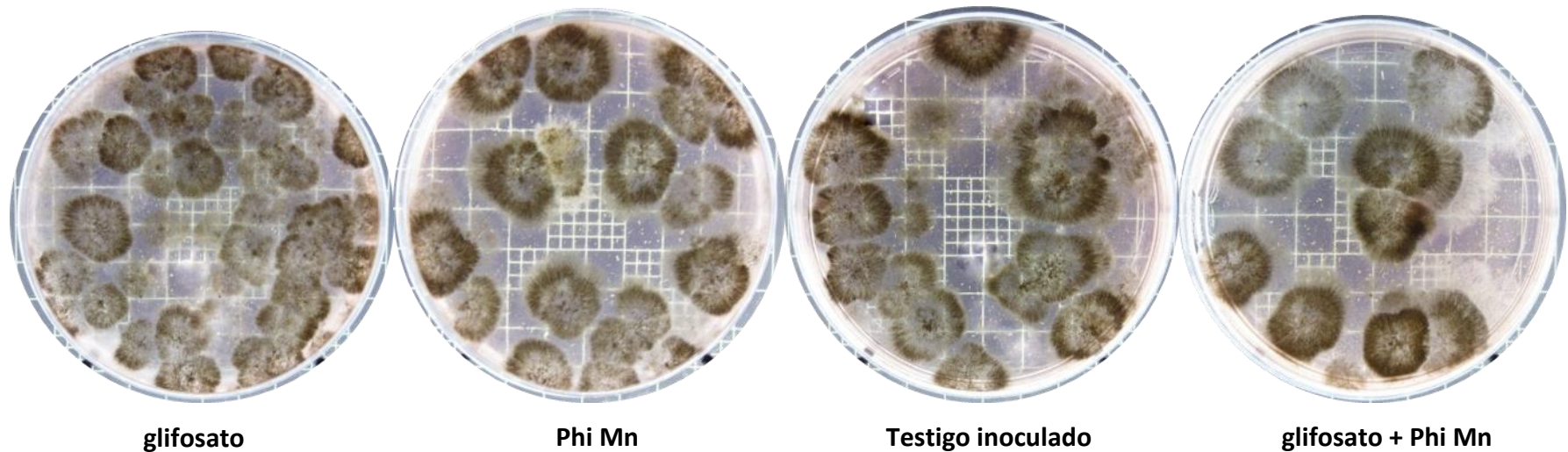


Figura 3.5 UFC de *M. phaseolina*/0,005 g de raíz de soja para los distintos tratamientos, 37 días después de la aplicación de los mismos.

3.3.2- Variables agronómicas de interés

3.3.2.1- Biomasa aérea

La biomasa aérea de las plantas de soja no se vio afectada por los tratamientos probados, a los 60 días post-emergencia (Fig. 3.6).

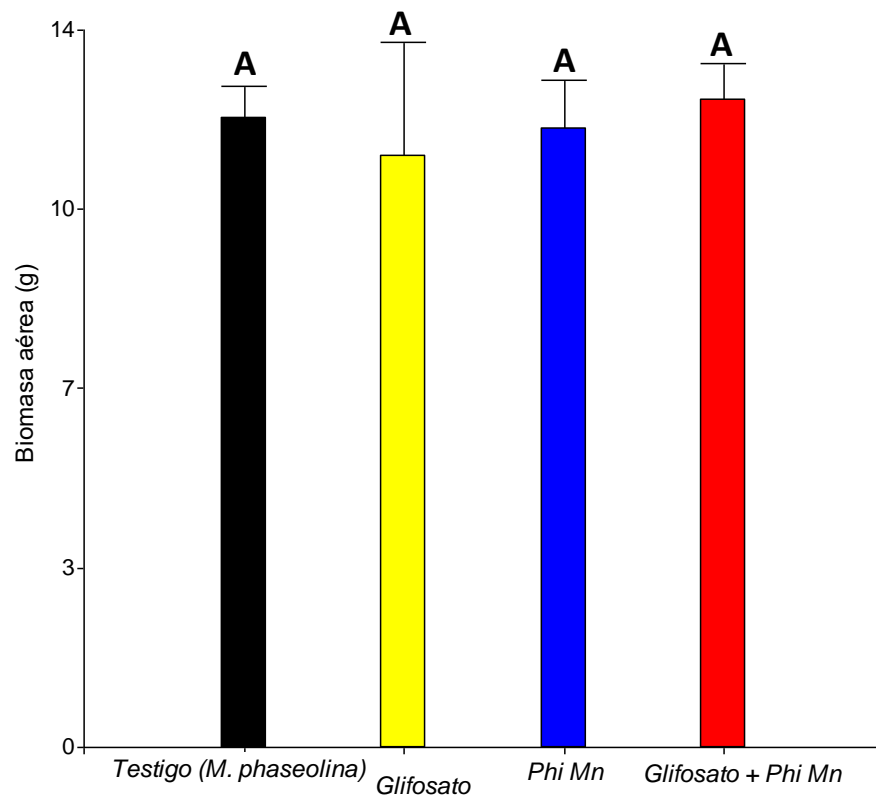


Figura 3.6 Biomasa aérea promedio de plantas de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas representan los desvíos estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).

3.3.2.2- Biomasa radical

El tratamiento Phi Mn generó la mayor biomasa radical (Fig. 3.7). Dicho tratamiento presentó un 22% más de peso radicular que el testigo inoculado. El resto de los tratamientos no difirieron estadísticamente entre sí.

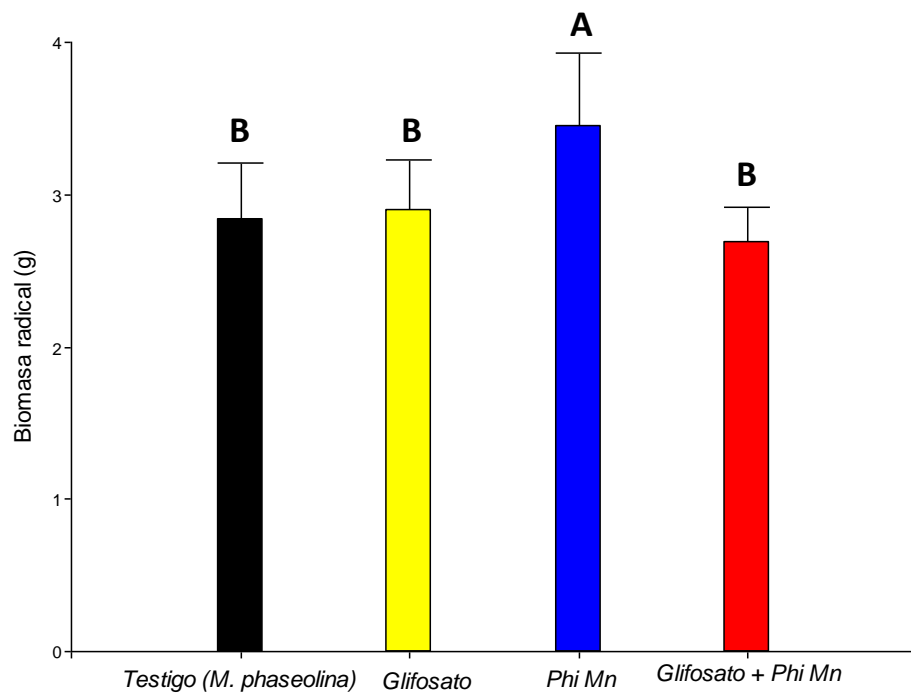


Figura 3.7 Biomasa radical promedio de plantas de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos probados. Las barras sobre las columnas representan los desvíos estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).

3.3.2.3- N° vainas/planta

El glifosato presentó el menor número de vainas/planta ($p < 0,05$) (Fig. 3.8). Mientras que los tratamientos, glifosato + Phi Mn y Phi Mn sólo no se distinguieron estadísticamente del testigo ($p > 0,05$).

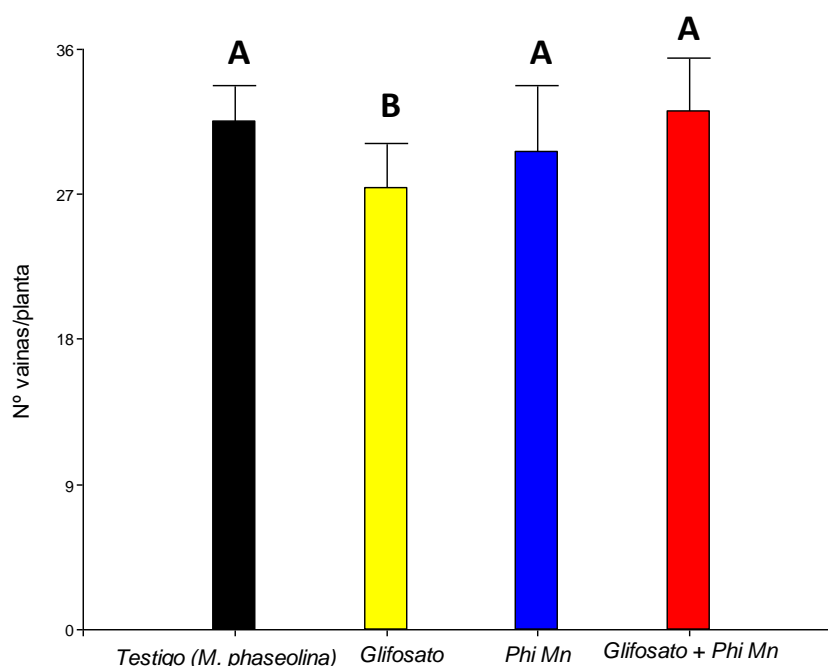


Figura 3.8 Número de vainas/planta de soja promedio 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas representan los desvíos estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Test DGC).

3.4- DISCUSIÓN

En esta tesis el aumento de la severidad de la podredumbre carbonosa generado por el glifosato, no fue significativo estadísticamente. Por lo cual, se rechaza la hipótesis 4 (la aplicación de glifosato *in vivo*, provoca un aumento en la severidad de la infección de la podredumbre carbonosa de la base del tallo). No obstante, si el experimento hubiera contado con una potencia mayor, es probable que la tendencia a aumentar la severidad de la enfermedad observada para el glifosato, que es relevante a nivel fitopatológico, hubiera sido ratificada a nivel estadístico.

Varios autores señalan que las plantas aplicadas con glifosato no presentan diferencias en la susceptibilidad a enfermedades en relación a testigos no tratados (Kandel *et al.*, 2015; Barnett *et al.*, 2011, 2012; Kirk *et al.*, 2013; Canaday *et al.*, 1986). Mengistu *et al.* (2013), en estudios realizados a campo sobre soja RR tratada con glifosato, informaron que aplicaciones múltiples del herbicida no provocaron aumentos en los

niveles de la podredumbre carbonosa (*M. phaseolina*) en ambientes en siembra directa. Sin embargo, también observaron que en ambientes laboreados y con sólo dos aplicaciones de glifosato, la severidad de la enfermedad se vio incrementada, especialmente en condiciones de altas temperaturas y sequía (Mengistu *et al.*, 2013).

Por otro lado, la tendencia a incrementar la severidad de la enfermedad registrada para el glifosato en esta tesis ha sido reportada por otros autores con distintas enfermedades (Geisler *et al.*, 2002; Zaccaron, 2013; Johal y Huber, 2009; Hornby *et al.*, 1998; Brammall y Higgins, 1988; Babiker *et al.*, 2011; Descalzo *et al.*, 1996). La lista de fitopatógenos estimulados por el glifosato está encabezada por hongos que causan pudriciones de raíz, base del tallo y colonización vascular (Huber, 2010). Huber *et al.* (2005) informaron un importante aumento de la gravedad de la podredumbre radicular causada por *Corynespora cassiicola*, luego de la aplicación de glifosato en soja RR. También Larson *et al.* (2006) notaron un incremento en la severidad de enfermedades causadas por *F. oxysporum* y *R. solani* en remolacha azucarera RR tratada con glifosato.

Contrariamente, estudios con trigo RR (*Triticum aestivum* L.) han demostrado que el glifosato posee efectos curativos y preventivos contra *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Westend.), y *Puccinia triticina* Eriks., causantes del estriado y la roya de la hoja, respectivamente (Feng *et al.*, 2005; Anderson y Kolmer, 2005). También se ha registrado un efecto positivo de la aplicación de glifosato para el control de la roya asiática causada por *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow y Sydow) en soja RR, en estudios preliminares en invernáculo (Feng *et al.*, 2005). Sin embargo, en experimentos realizados a campo, también en soja RR tratada con hasta cuatro aplicaciones del herbicida, Reis *et al.* (2012) no encontraron diferencias significativas en el control de dicha enfermedad.

En el presente trabajo, el glifosato generó una disminución significativa del N° de vainas/planta, lo cual puede estar relacionado con la tendencia observada en este tratamiento a generar una mayor severidad de enfermedad. Las raíces de las plantas tratadas con glifosato se encontraban mayormente dañadas, lo que puede haber dificultado la absorción y traslocación de nutrientes. El hongo *M. phaseolina* causa el debilitamiento progresivo de la planta (Mengistu *et al.*, 2007). Este patógeno produce microesclerocios en los haces vasculares y en la médula de la soja, los cuales pueden bloquear el flujo de agua (Mengistu *et al.*, 2013). Esto, a su vez, podría interferir con la formación de vainas y llenado de granos (Bowers y Russin, 1999).

Más allá de que en tests *in vitro* el Phi Mn había demostrado un comportamiento antifúngico directo (capítulo II), *in vivo* no redujo la severidad de la podredumbre carbonosa como se esperaba. Contrariamente, generó un leve estímulo de la misma (si bien no presentó diferencias significativas en relación al testigo). En consecuencia, se rechaza la hipótesis 5 (la aplicación de Phi Mn sólo, reduce la severidad de la enfermedad en las raíces).

Wicks *et al.* (1991) informaron que aplicaciones de Phi, inmediatamente posteriores a la infección, generan una reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad causada por el mildiu de la vid (*Plasmopara viticola* (Berk. et Curtis ex. de Bary) Berl. et de Toni) por hasta 10 días post-aplicación. Gisi *et al.* (2002) observaron que aplicaciones de Fosetil-Al (esencialmente el mismo ingrediente activo que los Phi) después de la infección, contra el mismo patógeno, proporcionan control por hasta 2 días post-aplicación. Resultados similares fueron obtenidos por Rebollar-Alviter *et al.* (2007) en frutilla. En el presente trabajo la severidad fue medida 37 días post-aplicación. Lo cual podría haber enmascarado cualquier control o reducción de la enfermedad producido

por el Phi Mn en los días inmediatamente posteriores a la aplicación. Sin embargo, se eligió ese momento para cuantificar la severidad porque la podredumbre carbonosa se manifiesta generalmente en las etapas finales del cultivo (Cabrera *et al.*, 2001).

Otra de las razones por las cuales en este trabajo no se observaron efectos del Phi Mn sobre la severidad de la podredumbre carbonosa, podría ser que éste fue aplicado 15 días después de la inoculación. La actividad protectora de los Phi aplicados previo a la infección es reconocida para diferentes enfermedades causadas principalmente por Oomycetes, con muy buenos resultados (Browne y Viveros, 2005; Chaluvvaraju *et al.*, 2004; Rohrbach y Schenck, 1985; Stiles *et al.*, 2005; Vawdrey *et al.*, 2004). No obstante, en el presente trabajo, la aplicación de los Phi se efectuó 15 días post-infección, lo cual puede haber incurrido en un costo energético adicional para la planta que el testigo inoculado no sufrió. Ese ligero costo energético pudo haber ocasionado una ventaja para el patógeno, que generó una mayor infección que en el testigo. El uso de inductores de las defensas no siempre resulta en beneficios para la producción, ya que la activación de la resistencia presenta una alta demanda energética para la planta (Dietrich *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2005). Además, en esta tesis, se utilizó una única aplicación de Phi Mn a una dosis de 0,2 L/ha (dosis y momento comercial). Sería interesante efectuar nuevos estudios que evalúen la severidad de la podredumbre carbonosa en soja a diferentes tiempos desde la aplicación, con distintos momentos de pulverización de Phi (pre y post-infección) y a distintas dosis.

Más allá de lo comentado, el tratamiento de Phi Mn presentó la mayor biomasa radicular. En tal sentido, se han informado propiedades de estimulación del crecimiento por parte de los Phi (Lovatt y Mikkelsen, 2006). Una sola aplicación foliar de Phi antes de floración en naranjas “Valencia” aumentó significativamente el número de flores, el rendimiento y los sólidos solubles totales en comparación con un control sin tratar (Albrigo, 1999). Las respuestas fisiológicas de la planta al Phi pueden estar relacionadas con su efecto sobre el metabolismo del azúcar, la estimulación de la ruta del ácido shikímico, o cambios internos químicos u hormonales (Lovatt y Mikkelsen, 2006).

Finalmente, la mezcla de glifosato + Phi Mn presentó la mínima severidad de la podredumbre carbonosa. Por lo tanto, existen evidencias para aceptar la hipótesis 6 (la mezcla de glifosato con Phi Mn genera una reducción de la severidad de la enfermedad, comparada con aquellas plantas enfermas tratadas con glifosato solamente).

Gomes *et al.* (2013) informaron que las aplicaciones de glifosato en mezcla con Phi sobre maíz RR generaban fitotoxicidad. No obstante, en el presente trabajo no hubo indicios de tales efectos fitotóxicos sobre las plantas de soja tratadas con la mezcla. Además, es importante destacar que no se han encontrado en la literatura efectos del glifosato en mezcla con Phi Mn para el manejo de *M. phaseolina*. Existen trabajos que estudian el control de este patógeno mediante tratamientos de semilla con fungicidas y aplicación de los mismos al suelo. Ilyas *et al.* (1975) en estudios de campo con suelo inoculado reportaron que aplicaciones del fungicida benomil al suelo redujeron la cantidad de microesclerocios de *M. phaseolina*. También se ha documentado la disminución de la enfermedad por la aplicación de benomil y tiabendazole en semillas, pero éstos presentaron fitotoxicidad (Ilyas *et al.*, 1975). Sin embargo, una vez que la enfermedad se ha establecido, estos métodos podrían ser poco prácticos o inefectivos. Los tratamientos de semilla con fungicidas no protegen al cultivo por períodos prolongados; y, la aplicación de fungicidas al suelo es anti económica y puede perjudicar la actividad de los microorganismos benéficos (Jeyarajan *et al.*, 1991). Esto pone de manifiesto la importancia de contar con herramientas que aplicadas foliarmente puedan movilizarse hacia las raíces, como la mezcla de glifosato + Phi Mn. Abd El-Hai

et al. (2009) reportaron que aplicaciones foliares de ácido cítrico, ácido salicílico, Mn y Zn en conjunto con la aplicación de los mismos tratamientos a las semillas lograron reducir la severidad de la podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina* en girasol.

Las razones por las cuales la combinación de glifosato con Phi Mn provoca el abrupto descenso en los niveles de severidad de la podredumbre carbonosa no están claras. Huber (2010) reportó que los productos formulados con micronutrientes, como los Phi Mn, mantienen la disponibilidad de los mismos para la planta sin afectar la actividad herbicida del glifosato en mezclas de tanque. Así, los Phi Mn podrían compensar las deficiencias de Mn ocasionadas por el glifosato. Un adecuado sustento de este micronutriente es necesario para una máxima formación de lignina, la cual está asociada a aumentos en las barreras físicas contra la entrada de patógenos (Cakmak *et al.*, 2009). Incluso, se ha registrado un control eficiente de la podredumbre carbonosa en soja mediante la fertilización de Mn en combinación con K administrados directamente al suelo, sin aplicación de glifosato (Tobar *et al.*, 2014). De esta manera, el aporte de Mn podría reducir la aparición o intensidad de las enfermedades en el cultivo y optimizar el rendimiento (Huber, 2010). Ferraris y Couretot (2012) observaron un aumento de rendimiento en soja RR de 225, 9 kg/ha con la aplicación foliar de glifosato + Phi Mn vs soja RR tratada con glifosato sólo, a dosis de campo. Los autores sugirieron que las diferencias se debieron a un efecto combinado de la nutrición (Mn) y el impacto “fungicida” del Phi.

Sin embargo, esto no explica por qué el tratamiento de glifosato + Phi Mn disminuyó el nivel de enfermedad incluso por debajo del testigo inoculado. Poco se conoce de la relación entre glifosato y Phi Mn y su interacción dentro de la planta. Serán necesarias nuevas investigaciones que se centren en la relación bioquímica entre estos ingredientes activos, dentro y fuera de la planta, y su efecto sobre hongos fitopatógenos para esclarecer esta cuestión.

3.5 CONCLUSIONES

En este capítulo, el estudio se focalizó en el impacto del glifosato, el glifosato + Phi Mn y el Phi Mn, en el sistema planta-patógeno (soja RR – *M. phaseolina*). Se observó que, si bien el glifosato genera una clara tendencia de incremento de la podredumbre carbonosa (30% más de severidad que el testigo inoculado), éste no es significativo estadísticamente. No obstante, dicho aumento resulta fitopatológicamente relevante, ya que las raíces de las plantas tratadas con glifosato se encontraban deterioradas y más afectadas por la enfermedad. De hecho, el N° de vainas/ planta de soja, se vio disminuido significativamente en el tratamiento con glifosato. La falta de sensibilidad del análisis estadístico para detectar esta diferencia en la severidad entre el glifosato y el testigo, probablemente responda a una baja potencia del experimento efectuado. Será interesante llevar a cabo nuevos experimentos con un mayor número de réplicas que permitan aclarar si la tendencia encontrada puede resultar estadísticamente significativa.

Contrario a lo que se esperaba en base a la bibliografía consultada (Browne y Viveros, 2005; Chaluvvaraju *et al.*, 2004; Vawdrey *et al.*, 2004), el Phi Mn no redujo la severidad de la enfermedad. Sería interesante efectuar nuevas investigaciones al respecto, analizando varios momentos de aplicación y dosis de los Phi Mn.

Por otro lado, el control de la podredumbre carbonosa obtenido mediante la aplicación de glifosato + Phi Mn resulta un avance de importancia para el manejo de esta enfermedad. En la actualidad el manejo de la podredumbre carbonosa se realiza

principalmente mediante prácticas culturales, aplicación de fungicidas al suelo y tratamientos de semilla con fungicidas convencionales. Éstos últimos, no son de utilidad aplicados foliarmente porque no llegan al sitio de infección de *M. phaseolina*. Consecuentemente, la mezcla de glifosato con Phi Mn, se presenta como un tratamiento fungitóxico foliar atractivo para el manejo de esta enfermedad, debido a que ambos ingredientes activos pueden traslocarse hacia las raíces.

Las causas por las cuales la combinación del herbicida y el Phi Mn generan esta disminución en la intensidad de la enfermedad causada por *M. phaseolina* en soja, son desconocidas. En el capítulo IV se estudian los efectos de estos tratamientos sobre los parámetros del estrés y la actividad de las enzimas de defensa. Dichos estudios podrían constituir un primer paso para elucidar los motivos por los cuales la mezcla de glifosato + Phi Mn genera cambios dentro de la planta que afectan el desarrollo de la enfermedad. También se estudian los efectos del glifosato sobre el estrés oxidativo, los cuales podrían estar vinculados con el aumento de la susceptibilidad a enfermedades en las plantas (Gomes *et al.*, 2014).

Capítulo IV:

Efectos del glifosato y del fosfito de manganeso *in vivo* sobre el estado oxidativo de plantas de soja RR y de enzimas relacionadas con la defensa

4.1- INTRODUCCIÓN

La activación de las vías de resistencia en las plantas, como la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), generalmente lleva a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (van Loon y van Strien, 1999). Las ROS conducen a una respuesta de hipersensibilidad (HR) (Agrios, 1998), la que consiste en una muerte rápida y localizada de células en el sitio de infección. Esto delimita la colonización del tejido por parte del patógeno. Seguido de la activación de la HR, partes distantes y no infectadas de la planta pueden desarrollar resistencia a futuras infecciones (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

Las ROS, tales como O_2^- y H_2O_2 , se producen comúnmente bajo condiciones de estrés y son especies fuertemente oxidantes que rápidamente pueden atacar cualquier tipo de biomoléculas y causar daño. Cuando el daño causado por las ROS se da como peroxidación lipídica, éste se puede medir a partir de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Aránguiz *et al.*, 2009).

Para protegerse del daño, las células de las plantas poseen enzimas detoxificantes de radicales libres, tales como la catalasa (CAT), guaiacol peroxidasa (GPOX) y superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 4.1). Estas enzimas juegan un papel crucial en la defensa de las células de las plantas contra el daño oxidativo en los sitios donde aumenta la generación de ROS (Kuniak y Sklodowska, 2001). Asimismo, existen antioxidantes no enzimáticos tales como el glutatión reducido (GSH) y enzimas que intervienen en la regeneración del mismo en las células, como la glutatión reductasa (GR) (Pnueli *et al.*, 2003) (Fig. 4.1). La función conjunta de estos antioxidantes, juega un papel sustancial en la eliminación de las ROS y en el mantenimiento del estado fisiológico redox de los organismos (Cho y Seo, 2005).

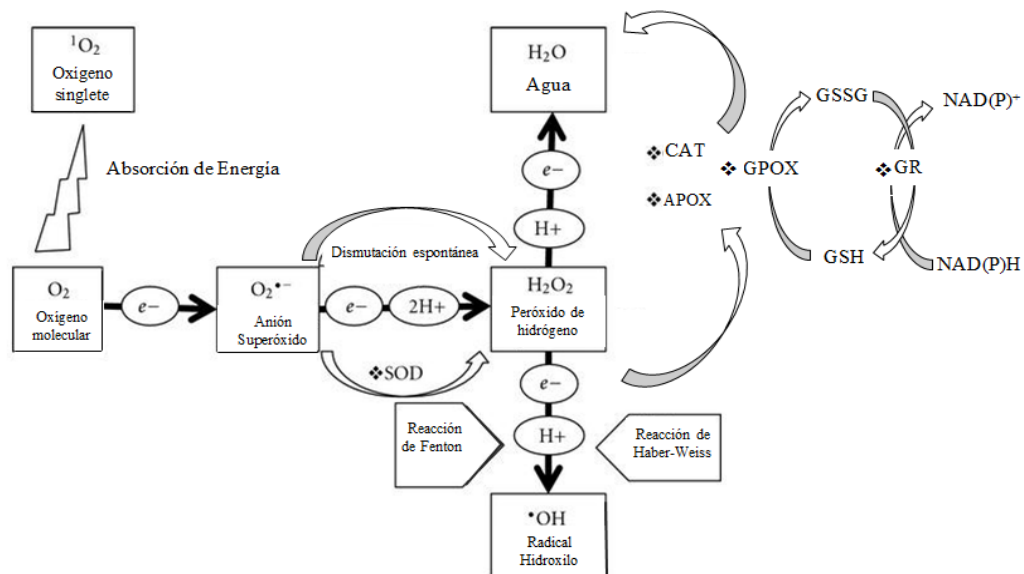


Figura 4.1 Representación esquemática de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las plantas. La activación del O_2 ocurre mediante dos mecanismos diferentes: la reducción monovalente gradual de O_2 conduce a la formación de O_2^- , H_2O_2 y OH^\bullet , mientras que la transferencia de energía a O_2 conduce a la formación de 1O_2 . El O_2^- es fácilmente dismutado a H_2O_2 bien de forma no enzimática o mediante la enzima SOD. El H_2O_2 es convertido en H_2O por las enzimas CAT, GPOX, y APX. La enzima GR interviene en la regeneración de Glutatión oxidado (GSSG) a Glutatión reducido (GSH), el cual permite la dismutación no enzimática de H_2O_2 a H_2O . Adaptado de Sharma *et al.* (2012) y Racchi (2013).

La inducción de la SAR aumenta la producción de lignina, produciéndose el reforzamiento de la pared celular asociada a compuestos fenilpropanoides y por deposición de calosa (van Loon y van Strien, 1999). También, se produce la síntesis de fitoalexinas y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP): β 1,3 glucanasas y quitinasas. Finalmente, se observa un aumento de la actividad de diversas enzimas relacionadas con la defensa, tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenoloxidasa (PPO) y lipoxigenasa (LOX) (van Loon y van Strien, 1999).

La PAL es una enzima inducible que responde a estreses bióticos y abióticos tales como patógenos, radiación UV y bajas temperaturas. Cataliza la deaminación no oxidativa de la fenilalanina a trans-cinamato, el primer paso en la vía de los fenilpropanoides (Fig. 4.2). Éstos son precursores de una amplia gama de compuestos fenólicos involucrados en la defensa de las plantas, tales como el ácido salicílico, fitoalexinas y ligninas (Fig. 4.2) (Dixon y Paiva, 1995; La Camera *et al.*, 2004).

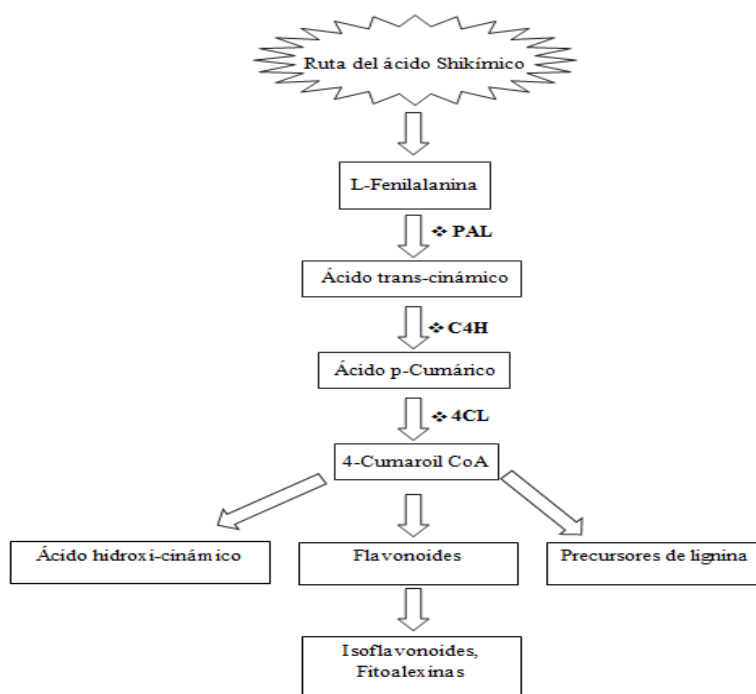


Figura 4.2 Representación esquemática de la vía de los fenilpropanoides en donde interviene la enzima PAL. Esta enzima es un precursor de compuestos fundamentales para la defensa de la planta como fitoalexinas y lignina. C4H: cinamato-4-hidrolasa; 4CL: 4-Cumarato CoA ligasa. Adaptado de Sriprasertsak *et al.* (2002) y Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos (2012).

La PPO es una enzima que participa en la oxidación de polifenoles a quinonas (compuestos con actividad antimicrobiana) (Fig. 4.3) y en la lignificación de las paredes celulares durante el ataque de ciertos microorganismos (Thipyapong *et al.*, 1995; Beckman, 2000; Constabel *et al.*, 2000). Se ha informado que interviene en la síntesis de Esculetina (Fig. 4.3), un compuesto que puede actuar como antioxidante y podría contribuir a la respuesta de defensa de las plantas (Blagbrough *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se conoce sobre el rol específico de este compuesto. Diversos estudios han sugerido que la PPO puede estar relacionada con la resistencia a enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus (Beckman, 2000). También es una enzima inducible por numerosos factores bióticos y abióticos, incluyendo heridas mecánicas, fúngicas, infecciones bacterianas, y el tratamiento con hormonas (Li y Steffens, 2002).

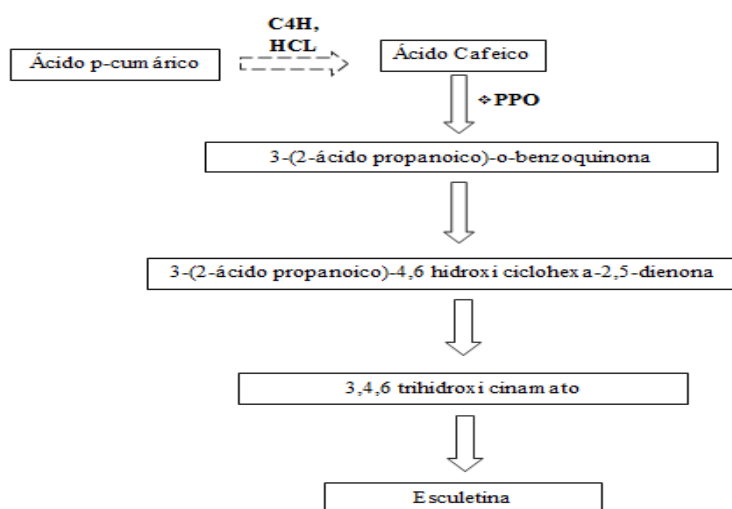


Figura 4.3 Representación esquemática de la oxidación del ácido cafeico, proveniente de la vía de los fenilpropanoides, por la enzima PPO. Para simplificar, los pasos de isomerización cis-trans no se muestran. La flecha punteada representa múltiples reacciones. Adaptado de Sato (1967) y Arají *et al.* (2014).

La inducción de genes de LOX durante las interacciones planta-patógeno se ha informado en varias especies. La función de LOX en la defensa contra patógenos parece estar relacionada a la síntesis de un número de diferentes compuestos con funciones de señalización (Creelman y de Mullet, 1997; Parchmann *et al.*, 1997), actividad antimicrobiana (Croft *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1999), y de oxidación de lípidos necesaria para el desarrollo de la HR (Fig. 4.4) (Liavonchanka y Feussner, 2006). Además, se ha reportado que la LOX interviene en la vía de síntesis de Ácido Jasmónico (JA) (Fig. 4.4), el cual, a su vez, interviene como agente regulador y de señalización de la resistencia sistémica inducida (ISR) (Porta y Rocha-Sosa, 2002).

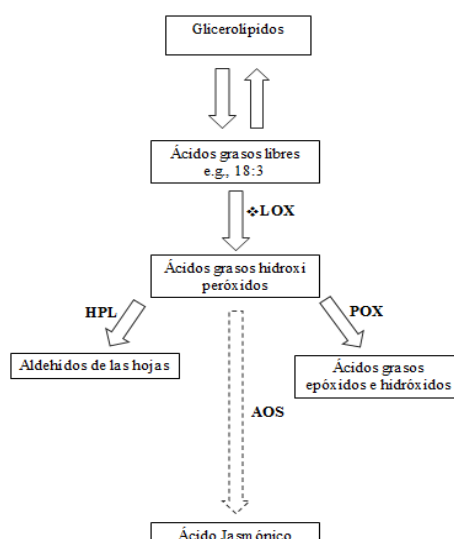


Figura 4.4 Representación esquemática del metabolismo de las oxilipinas donde interviene la enzima LOX. La flecha punteada representa múltiples reacciones. HPL: Hidroperóxido liasa; AOS: aleno óxido sintasa; POX: peroxigenasa. Adaptado de Robinson y Bostock (2015) y Yan *et al.* (2013).

Las β 1,3 glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en las plantas, implicadas en muchos procesos metabólicos como estrés, infección y desarrollo (Fuentes-Silva y Rodríguez-Romero, 2006). Existe evidencia considerable que sugiere que estas enzimas son parte tanto de las defensas constitutivas como de las inducidas de la planta frente a patógenos fúngicos (Belkis y Ondina, 2011). Debido a su capacidad para hidrolizar β -1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias, han sido designadas como PRP pertenecientes a la familia 2 (PR-2) (Fuentes-Silva y Rodríguez-Romero, 2006). También actúan indirectamente digiriendo polisacáridos tanto del patógeno como del hospedante y desencadenando la HR (Fig4.5) (Belkis y Ondina, 2011).

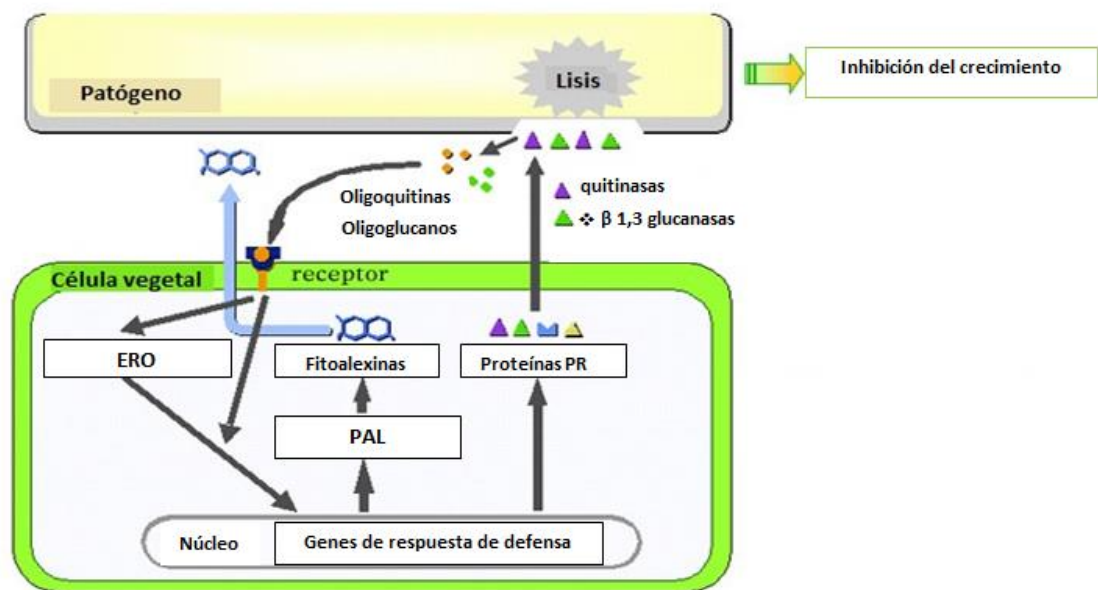


Figura 4.5 Representación esquemática de la acción de las β 1,3 glucanasas en la defensa de las plantas (Nishizawa, 2005).

Los elicitores son compuestos, naturales o sintéticos, que actúan como elementos señal a bajas concentraciones, generando respuestas de defensa en la planta similares a las inducidas por la infección por patógenos (Boller, 1995; Gómez-Vásquez *et al.*, 2004; Thakur y Sohal, 2013).

Los Phi actúan como elicitores que ayudan a la planta a protegerse mediante la estimulación de la vía del ácido shikímico. Durante este proceso las plantas producen y acumulan fitoalexinas que les permiten proteger sus tejidos del ataque de los patógenos (Thao y Yamakawa, 2009). Las plantas tratadas con Phi parecen ser capaces de generar un ambiente antimicrobiano más efectivo que aquellas no tratadas con estos compuestos (McDonald *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la aplicación de Phi aumenta la expresión de genes relacionados con la defensa en *Arabidopsis* infectada con *Phytophthora cinnamomi* (Eshraghi *et al.*, 2011).

El descubrimiento de los elicitores ha hecho que estas moléculas se posicionen como complemento o alternativa de los fungicidas tradicionales en la protección de cultivos (Thakur y Sohal, 2013). Sin embargo, el modo de acción de los Phi es todavía desconocido y debatido (Massoud *et al.*, 2012).

En contraposición, existen moléculas que parecen reducir las defensas de las plantas a determinadas enfermedades. Ciertos estudios indican que el glifosato tiene efectos

perjudiciales sobre los mecanismos de defensa de las plantas. Zobiolo *et al.* (2010) observaron que las aplicaciones de glifosato en cultivares de soja RR, disminuían las concentraciones de Mn. Este micronutriente interviene en la regulación de muchas funciones fisiológicas críticas. Por lo tanto, una deficiencia o cambio en la disponibilidad de este elemento puede afectar en gran medida la resistencia a enfermedades y plagas de la planta (Datnoff *et al.*, 2007). Estos reportes han generado controversia en torno al glifosato y su relación con la susceptibilidad y reemergencia de varias enfermedades en el cultivo de soja, como se discutió en el capítulo III.

El estudio del efecto del Phi Mn y el glifosato sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa mencionadas más arriba, cobra vital importancia porque permitirá comenzar a dilucidar los posibles mecanismos de la inducción de defensas en la soja contra *M. phaseolina* y su relación con la severidad de la enfermedad. También resulta interesante evaluar la evolución de dichos parámetros de estrés y complejos enzimáticos antioxidantes y de defensa en el tiempo, luego de la aplicación y en la última etapa del cultivo cuando la podredumbre carbonosa se expresa con mayor intensidad.

Estos análisis se presentan en este capítulo y permiten cumplir con el objetivo específico 3.

4.2- MATERIALES Y MÉTODOS

En invernáculo, se llevó a cabo otro experimento sobre plantas de soja RR en macetas. Se utilizaron iguales técnicas que las descritas en el capítulo III para el armado de las macetas, siembra, inoculación y mantenimiento del experimento. En este caso, se utilizó un DCA con arreglo factorial de tres factores, *M. phaseolina*, glifosato y Phi Mn. De tal manera que los tratamientos quedaron conformados de la siguiente manera:

- Testigo (testigo absoluto)
- glifosato
- Phi Mn
- glifosato + Phi Mn
- *M. phaseolina* (M.p; Testigo inoculado)
- *M.p* + glifosato
- *M.p* + Phi Mn
- *M.p* + glifosato + Phi Mn

Se utilizaron los mismos productos y dosis que los descriptos en el capítulo III, 2,5 L/ha de glifosato y 0,2 L/ha de Phi Mn. Los momentos de aplicación también fueron iguales que en el experimento anterior: para el glifosato, 1 semana antes de la siembra y en V4; y para el Phi Mn en V4.

Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento. Se llevó a cabo un muestreo extractivo. Se tomaron y analizaron 3 muestras de cada tratamiento, 7 días desde aplicación (7 DDA), en V6 (Fehr y Caviness, 1977), para analizar el primer impacto de los mismos sobre los compuestos indicadores del estrés y defensas. Al concluir el experimento, 37 días desde aplicación (37 DDA), en R4 (Fehr y Caviness, 1977), se tomaron otras 3 muestras para estudiar el estado final de las defensas. De cada muestra se analizaron tanto los tejidos foliares, como los radiculares.

Se estimaron, por métodos espectrofotométricos (Noriega *et al.*, 2007; Zilli *et al.*, 2009) los niveles de GSH y la detección de TBARS. También, la actividad de sistemas isoenzimáticos relacionados con mecanismos de defensa en la planta; CAT (Becana *et al.*, 1986) LOX, PAL, PPO, GPOX y GR. También se cuantificaron las enzimas relacionadas con la patogénesis: β 1,3 glucanasas.

Además, se efectuó un estudio preliminar antes de aplicar los tratamientos, en el cual se analizó si la inoculación del patógeno en las plantas había resultado efectiva y si había cambios en relación al estado oxidativo y en las enzimas de defensa de la planta debidos al hongo. Las muestras se tomaron a los 15 días desde de la inoculación (15 DDI). En este caso se evaluó, además, la localización *in vivo* de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en raíces.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA por cada fecha y para cada tejido examinado y test de comparación de medias DGC, con un α de 0,05. Además, para estudiar las relaciones entre las variables correspondientes a la actividad enzimática y las UFC/ g raíz se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA). Antes de aplicar el PCA se analizó el índice de Kaiser- Meyer-Olkin (KMO) para comprobar si era adecuado factorizar las variables originales de forma eficiente.

A continuación, se detallan los distintos métodos de cuantificación utilizados para los diferentes compuestos.

4.2.1- Determinación de parámetros de estrés oxidativo

4.2.1.1- Localización *in situ* de O_2^-

Las raíces controles y las inoculadas se sumergieron en una solución de 0.1% de azul de nitrotetrazolio (NBT) en buffer fosfato de potasio (pH 6,4), conteniendo azida sódica 10 mM. Se infiltraron al vacío durante 5 min y se iluminaron hasta la formación de un precipitado oscuro. Las raíces se blanquearon por inmersión en etanol para visualizar las manchas oscuras (Zilli *et al.*, 2009).

4.2.1.2- Localización *in situ* de H_2O_2

Las raíces se sumergieron en una solución de 3,3'-Diaminobencidina (DAB) en buffer Tris-HCl pH 6,5 y se infiltraron al vacío durante 5 min. Luego se incubaron 2 h aproximadamente hasta que aparecieron manchas marrones características de la reacción de DAB con H_2O_2 . Las raíces se blanquearon con etanol para visualizar las manchas (Zilli *et al.*, 2009).

4.2.1.3- Determinación de TBARS

Las muestras frescas se homogeneizaron en solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v) y se centrifugaron a 3500×g durante 20 min. A una alícuota del sobrenadante (1 ml) se le adicionó 1 ml de solución de TCA al 20 % (p/v) conteniendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico y 100 μ l de hidroxitolueno butilado al 4% en etanol. La mezcla se calentó a 95°C durante 30 min y se enfrió en hielo. Se centrifugó a 10000×g durante 15 min y se determinó la absorbancia a 532 nm. La concentración de TBARS se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de 155/mM.cm (Zilli *et al.*, 2009).

4.2.1.4- Determinación del contenido de GSH

Los tioles no proteicos de las muestras se extrajeron en HCl 0,1 N (pH 2,0), relación 1:10 p/v (Schupp y Rennenberg, 1988). Se determinó el GSH total utilizando una mezcla de incubación estándar consistente en: 0,1 M de buffer fosfato de potasio (pH 7,5) conteniendo 6,3 mM de EDTA, 0,2 mM de NADPH, 0,6 mM de DTNB y 100 μ l del homogenato durante 12-15 min a 30°C; luego se agregaron 0,2 U/ml de glutatión reductasa y se midió el aumento de absorbancia a 412 nm debido a la formación de ácido 5-tio-(2-nitrobenzoico) (TNB). La curva estándar se obtuvo utilizando distintas concentraciones de una solución de GSH. Se graficó la pendiente en función de los equivalentes de GSH (Anderson, 1985).

4.2.2- Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa

Para determinar la actividad de las distintas enzimas, en primer lugar, se efectuó la extracción enzimática de los tejidos tanto foliares como radiculares. Para ello, se confeccionó un buffer de extracción PiK 50 mM, pH 7,2.

Se tomaron las muestras de hojas y raíces, las cuales se conservaron en freezer a - 40°C en bolsas plásticas destinadas para tal fin (Fig. 4.6 (A)). A cada una de las bolsas, se le adicionó el buffer de extracción descrito anteriormente en una relación 1/10 p/v (Fig. 4.6 (B)). Además, a cada muestra se le agregaron 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP). Una vez hecho esto, se machacaron los tejidos junto con el buffer dentro de las bolsas (Fig. 4.6 (C)). Se pasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó por 30 min a 15.000 rpm, a una temperatura de 4°C.

Luego, se separó el sobrenadante, se colocó en nuevos tubos eppendorf limpios y se descartó el pellet. Los tubos conteniendo el sobrenadante se conservaron en un freezer a -40°C hasta el momento de las determinaciones (Balestrasse *et al.*, 2001).

4.2.2.- Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

4.2.2.1.- Determinación de la actividad de CAT

El medio de reacción contenía 150 μ l del homogenato, buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,2) y 2 mM H₂O₂. La actividad de CAT se determinó a 30°C, midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm debida al consumo del peróxido de hidrógeno. Se determinó la constante de reacción de pseudo-primer orden ($k' = k$ [CAT]) de la disminución de la absorbancia del H₂O₂ y el contenido de CAT se calculó en pmol/mg proteína usando una $k = 4,7 \times 10^7$ M/s (Chance *et al.*, 1979).

4.2.2.2 - Determinación de la actividad de GR

La actividad de GR se midió a 28°C como la disminución de la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación de NADPH. La mezcla de reacción contenía 200 μ l del sobrenadante del extracto, 50 mM de buffer Tris-ClH (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 0,5 mM de GSSG, 0,15 mM de NADPH y 3 mM de MgCl₂ (Schaedle y Bassham, 1977).

4.2.2.3 - Determinación de la actividad de GPOX

La actividad de la guaiacol peroxidasa se midió como el incremento en la absorbancia a 470 nm debido a la formación de tetraguaiacol (coeficiente de extinción= 26,6 mM/cm) a 30°C. El medio de reacción contenía 30 µl de extracto, buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 10 mM de guaiacol y 10 mM de H₂O₂. Una unidad enzimática se define como los µmoles de guaiacol oxidado/min mg proteína (Balestrasse *et al.*, 2001).

4.2.2.2- Determinación de la actividad de las enzimas de defensa

4.2.2.4- Determinación de la actividad de PAL

En primer lugar se preparó un Buffer TRIS-HCl 50 mM pH 7,6 + EDTA consistente en 7,8014 g de TRIS Base, 4,5 ml de HCl y 0,29 g de EDTA en 1 litro de agua destilada. Luego, se confeccionó una solución de L-fenilalanina con 6,93 g de L-fenilalanina en 350 ml de Buffer TRIS-HCl (Assis *et al.*, 2001).

Se colocaron 1,8 ml de la solución de L-fenilalanina en tubos de hemólisis y se les adicionaron 200 µl del extracto enzimático descripto anteriormente. Los tubos se incubaron a 40°C por 2 h, midiendo la absorbancia a 290 nm a tiempo 0, 45, 90 y 120 (min). De esta forma se obtuvo una pendiente a lo largo del tiempo. Los resultados se expresan en mol ác. cinámico/ min mg proteína (Assis *et al.*, 2001).

4.2.2.5- Determinación de la actividad de PPO

Se preparó una solución de catecol, disolviendo 2,20 g de catecol en 200 ml de agua destilada de acuerdo a Chen *et al.* (2000).

En tubos de hemólisis de vidrio se colocaron 800 µl de la solución de catecol, 100 µl de agua destilada y 100 µl de extracto enzimático de las muestras de hoja y raíz recolectadas. Se agitó para homogeneizar y se dejó incubar a 25°C por 15 min. La absorbancia se registró a tiempo 0 y 15 min, a una longitud de onda de 420 nm. Los resultados se expresan como ΔAbs/min mg proteína (Chen *et al.*, 2000).

Una unidad enzimática corresponde a los μ moles de NADPH oxidados/min mg proteína (Schaedle y Bassham, 1977).

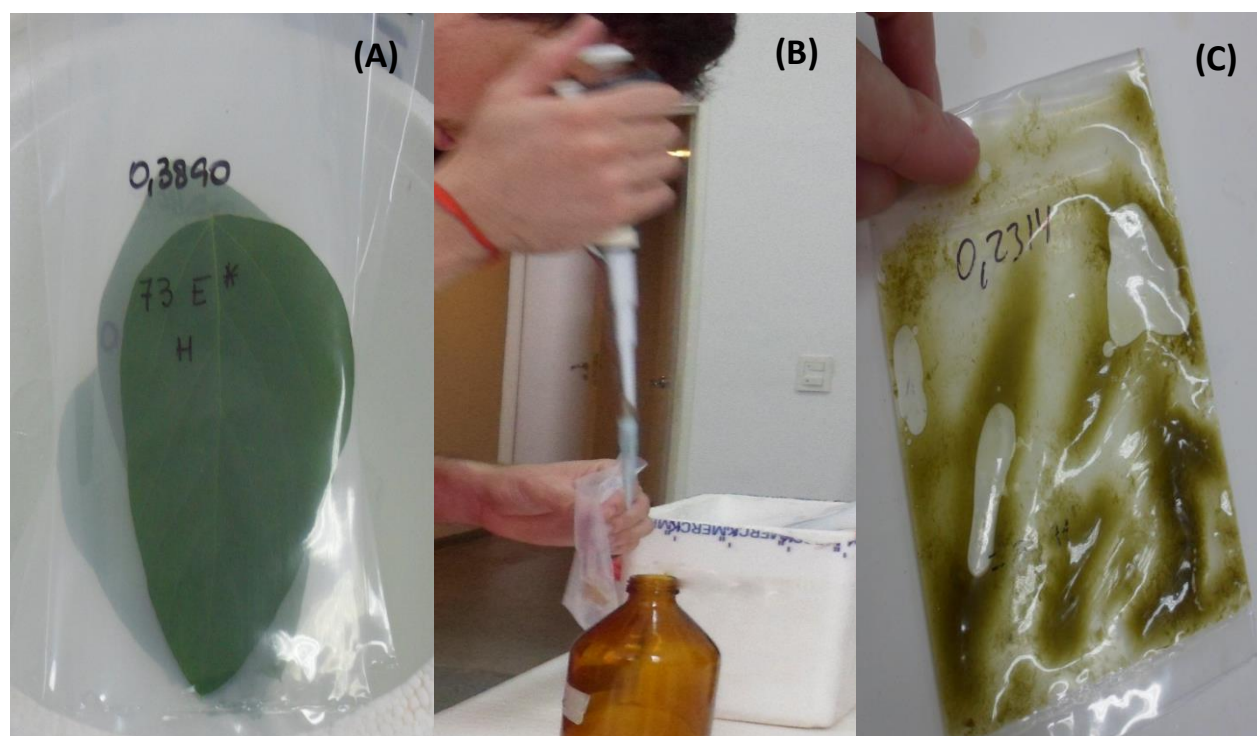


Figura 4.6 Proceso de extracción proteica: muestras de tejido foliar de soja pesadas y listas para congelar a -40°C (A); disposición del Buffer de extracción dentro de las bolsas de muestras de tejido de soja (B); extracto obtenido al machacar las muestras mencionadas (C).

4.2.2.6- Determinación de la actividad de β 1,3 glucanasa

Se confeccionó una solución de laminarina con 0,72 g de laminarina en 18 ml de agua destilada. Por otro lado, se preparó una solución de ácido dinitrosalicílico (DNS) disolviendo 0,035 g en 70 ml de agua destilada.

En tubos de hemólisis de vidrio, se colocaron 100 μ l de laminarina, luego se incorporaron 200 μ l del extracto enzimático obtenido de los tejidos muestreados. Se incubó 10 min a 40°C. Cumplido este tiempo, se agregaron 375 μ l de la solución de DNS en los tubos y se llevó a agua hirviendo por 5 min. Luego, se le agregaron 4,5 ml de agua destilada a todos los tubos y se homogeneizó. Finalmente, se midió la absorbancia a 500 nm (Pan *et al.*, 1991).

La actividad enzimática se determinó por medición del nivel de producción de azúcares reductores (Nelson, 1944) y se expresó en términos de actividad específica como mg de glucosa /min mg de proteína.

4.2.2.7- Determinación de la actividad de LOX

Se confeccionó un Buffer de determinación de Citrato PiNa 0,2 M, pH 6,5 (citrato = 0,2612 g/100 ml; $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ (12 H_2O) = 2,6098 g/100 ml) con 0,25% (v/v) de Tween 20 y ácido linoléico $2,28 \cdot 10^{-4}$ M (0,0068 g/100 ml) (Borthakur *et al.*, 1987).

Para cada determinación, se colocaron 30 μ l del extracto enzimático de los tejidos vegetales muestreados y 970 μ l del Buffer de determinación en una cubeta de cuarzo. Se agitó para homogeneizar y se midió la absorbancia a 234 nm debida a la oxidación del ácido linoléico (adición de O_2 cis-1,4). La medición se realizó durante 5 min a 25°C. Se utilizó un coeficiente de extinción molar de 25.000/ M.cm (Axelrod, 1974).

La actividad de LOX se expresa como Δ absorbancia/min mg de proteína.

4.2.3- Determinación de proteínas totales

Se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando como solución patrón albúmina de suero bovino.

En primer lugar, se preparó la solución “Bradford”, la cual contenía 0,01% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (p/v) de etanol, 8,5% (p/v) de ácido fosfórico. Se llevó a un volumen final de 1 litro y se pasó inmediatamente por papel de filtro.

Luego, se preparó una solución patrón de proteínas 10 μ g/ μ l de albúmina y se confeccionó una curva de calibración de 0 -10 μ g en un volumen final de 0,1 ml ajustando con el buffer apropiado.

Una vez obtenida la curva patrón, se procedió a la medición de las proteínas totales. Para ello, se colocó 1 ml de solución “Bradford” en tubos de hemólisis de vidrio y se les agregaron 5 μ l de extracto en el caso de que el tejido fuera hoja y 10 μ l en el caso de que se tratase de raíz. Se mezcló y se dejó reposar por 2 min para luego medir la absorbancia a 595 nm.

4.3- RESULTADOS

4.3.1- Impacto de la infección de *M. phaseolina* *in vivo* sobre el estado oxidativo de plantas de soja RR y de enzimas relacionadas con la defensa (15 DDI)

4.3.1.1- Determinación de parámetros de estrés oxidativo

4.3.1.1.1- Localización *in situ* de O_2^-

En la Figura 4.7 se puede observar que las raíces testigo provenientes de plantas sanas, presentan una coloración clara. Sin embargo, las raíces atacadas con el patógeno se encuentran más oscuras, teñidas con una coloración azulada. Esto indica que hay una mayor cantidad de anión superóxido en las raíces infectadas.

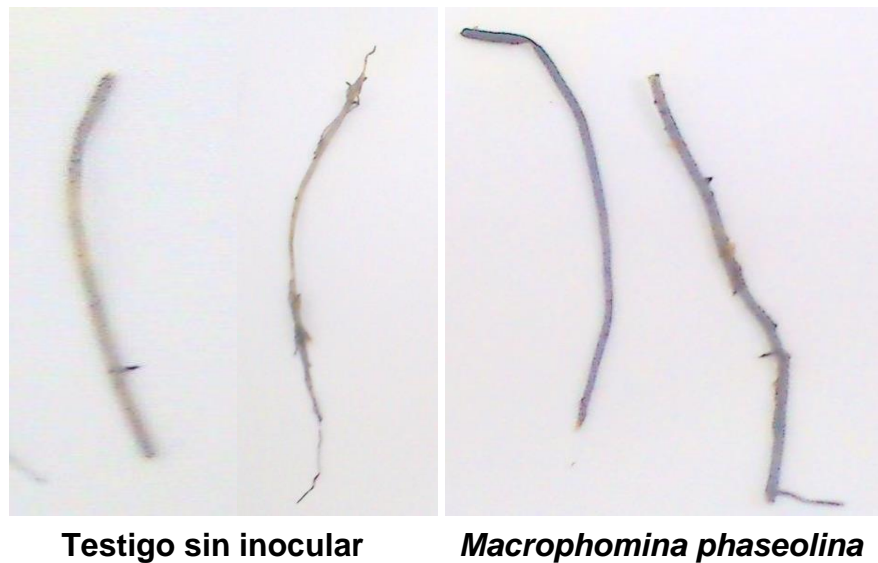


Figura 4.7 Raíces de soja teñidas con NBT (azul de nitrotetrazolio). Izq.: testigo; der: raíces inoculadas con el patógeno (*M. phaseolina*).

4.3.1.1.2- Localización *in situ* de H₂O₂

Nuevamente, las raíces infectadas por *M. phaseolina* se perciben más oscuras que las raíces sanas (Fig. 4.8). Esta tinción más oscura da cuenta del incremento de la producción del peróxido de hidrógeno *in situ*, lo cual podría estar relacionado con la generación de estrés oxidativo causado por el hongo.

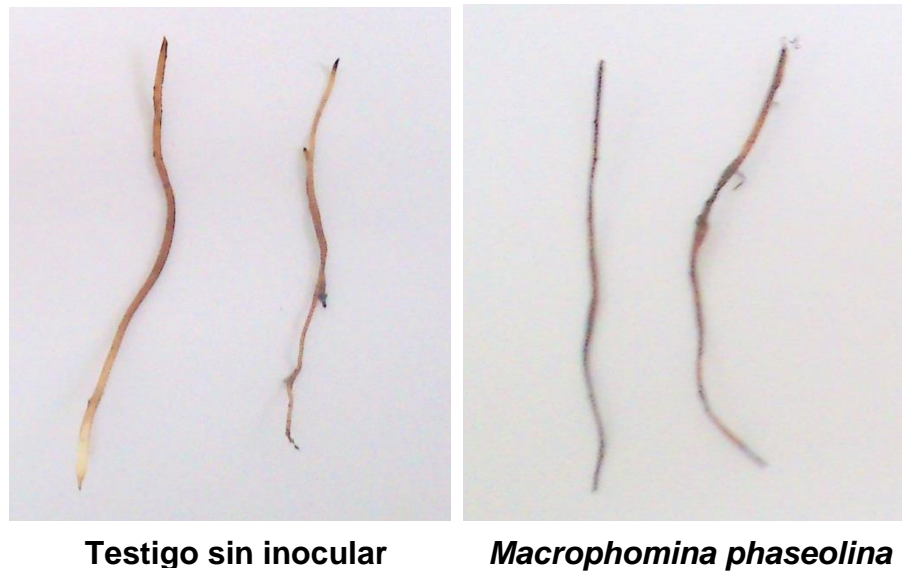


Figura 4.8 Raíces de soja teñidas con DAB (3,3'-Diaminobencidina). Izq.: testigo; der: raíces inoculadas con el patógeno (*M. phaseolina*).

4.3.1.1.3- Contenido de TBARS

El contenido de TBARS fue mayor para el tratamiento inoculado en comparación con el testigo ($p < 0,05$), tanto en las raíces como en hojas (Fig. 4.9). Sin embargo, en los tejidos radicales el daño fue mucho más marcado.

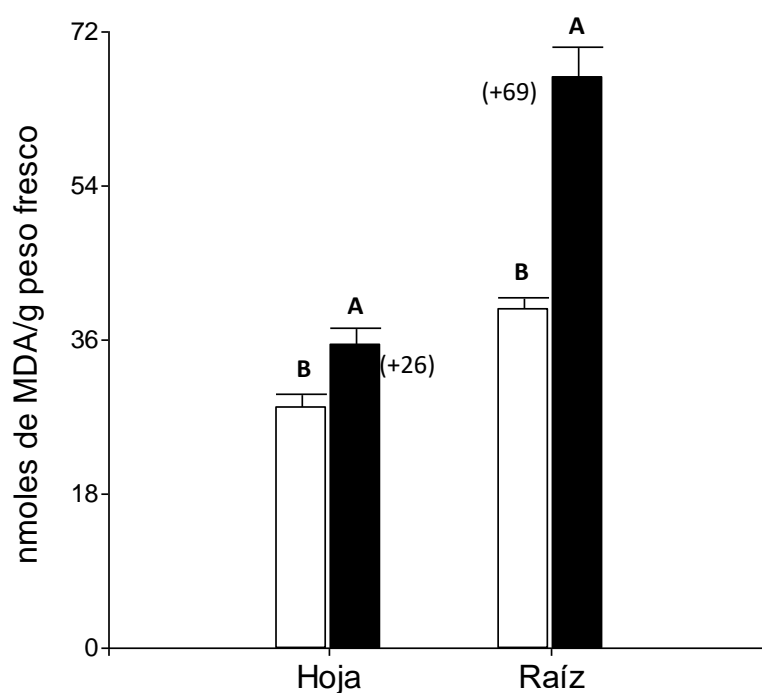


Figura 4.9 Contenido promedio de TBARS para muestras de hojas y raíces de soja para dos tratamientos: Testigo (columnas blancas) y *M. phaseolina* (columnas negras), 15 días después de la inoculación. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para hoja y raíz ($p < 0,05$) (Test DGC). Los números entre paréntesis indican % de variación del contenido de TBARS respecto del testigo.

4.3.1.1.4- Contenido de GSH

Con respecto al contenido de GSH, éste también resultó significativamente mayor en el tratamiento con *M. phaseolina* (Fig. 4.10). Las diferencias entre los tratamientos fueron notables tanto en los tejidos radiculares como en los foliares.

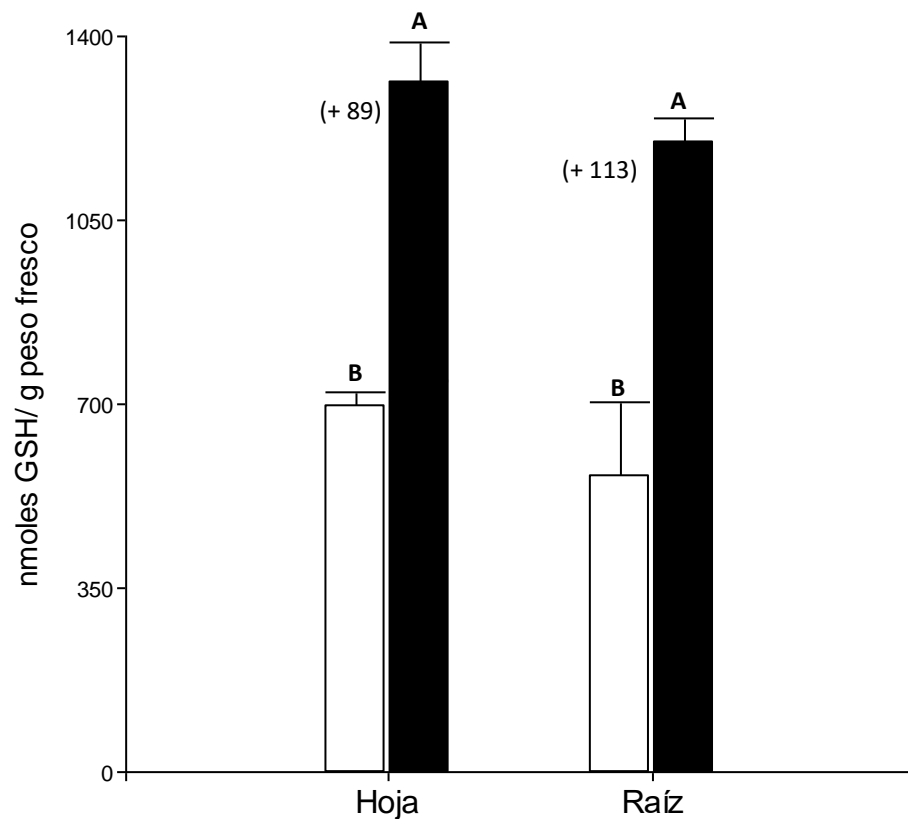


Figura 4.10 Contenido medio de GSH para muestras de hojas y raíces de soja para dos tratamientos: Testigo (columnas blancas) y *M. phaseolina* (columnas negras), 15 días después de la inoculación. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para hoja y para raíz ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican % de variación del contenido de GSH respecto del testigo.

4.3.1.1.5- Actividad de las enzimas antioxidantes

La actividad de CAT resultó significativamente mayor en las plantas inoculadas con el hongo (Tabla 4.1). Nuevamente, en la raíz la actividad fue marcadamente mayor que en los tejidos foliares.

Tanto la enzima GR, como la GPOX siguieron la tendencia de CAT y vieron incrementada su actividad por la infección de *M. phaseolina* en la parte subterránea y en la parte aérea de la planta (Tabla 4.1). De nuevo, en el tejido radical las diferencias fueron más relevantes.

Los datos de la actividad de GR en raíz fueron transformados mediante Log10 para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Todo esto indica que la infección de *Macrophomina phaseolina* activó los mecanismos antioxidantes enzimáticos de la planta.

4.3.1.1.6- Actividad de las enzimas de defensa

La actividad de las enzimas PAL, PPO, β 1,3 glucanasa y LOX se registró solamente en los tejidos foliares, debido a que los extractos de los tejidos radicales 15 DDI, no fueron suficientes para analizar todas las enzimas programadas.

Estas enzimas, siguieron la misma tendencia que las enzimas antioxidantes: todas mostraron una mayor actividad en los tratamientos infectados (Tabla 4.2), a excepción de PPO, la cual mostró una mayor actividad para la planta sana que la enferma.

La diferencia más importante entre los tratamientos infectados vs no infectados se percibió para la enzima PAL (Tabla 4.2).

Enzima	CAT Hoja	CAT Hoja	CAT Raíz	CAT Raíz	GR Hoja	GR Hoja	GR Raíz	GR Raíz	GPOX Hoja	GPOX Hoja	GPOX Raíz	GPOX Raíz
Tratamiento	(μ moles de H_2O_2 consumidos/ min mg prot)	% variación respecto del testigo	(μ moles de H_2O_2 consumidos / min mg prot)	% variación respecto del testigo	(nmoles de NADPH/ min mg prot)	% Variación respecto del testigo	(nmoles de NADPH/ min mg prot)	% variación respecto del testigo	(μ moles de guaiacol/ min mg prot)	% variación respecto del testigo	(μ moles de guaiacol/ min mg prot)	% variación respecto del testigo
Testigo	7,12 b	-	3,26 b	-	0,0002 b	-	0,012 b	-	0,01 b	-	0,29 b	-
<i>M. phaseolina</i>	11,67 a	+63,9	97,89 a	+2902,76	0,01 a	+4900	0,27 a	+2150	0,02 a	+100	0,42 a	+44,83

Tabla 4.1 Actividad media para las enzimas CAT, GR y GPOX y % de variación de la actividad de las mismas para los distintos tratamientos respecto del testigo, en hojas y raíces de soja, 15 días después de la inoculación con *M. phaseolina*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC).

Enzima	PAL	PAL	PPO	PPO	β 1,3 glucanasa	β 1,3 glucanasa	LOX	LOX
Tratamiento	(moles de ácido cinámico/min mg prot)	% variación respecto del testigo	(Δ Abs/min mg prot)	% variación respecto del testigo	(mg glucosa/ min mg prot)	% variación respecto del testigo	(Δ Abs/min mg prot)	% variación respecto del testigo
Testigo	188,14 b	-	0,036 a	-	0,00965 b	-	0,000031 b	-
<i>M. phaseolina</i>	573,74 a	+294,95	0,028 a	-22,22	0,01247 a	+29,22	0,000048 a	+54,83

Tabla 4.2 Media de la actividad de las enzimas PAL, PPO, β 1,3 glucanasa y LOX y su % de variación para los distintos tratamientos respecto del testigo en hojas de soja, 15 días después de la inoculación con *M. phaseolina*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC).

4.3.2- Efectos del glifosato y del Phi de Mn *in vivo* sobre el estado oxidativo de HOJAS de soja y de enzimas relacionadas con la defensa

4.3.2.1- Siete días desde aplicación (7 DDA)

4.3.2.1.1- Contenido de TBARS

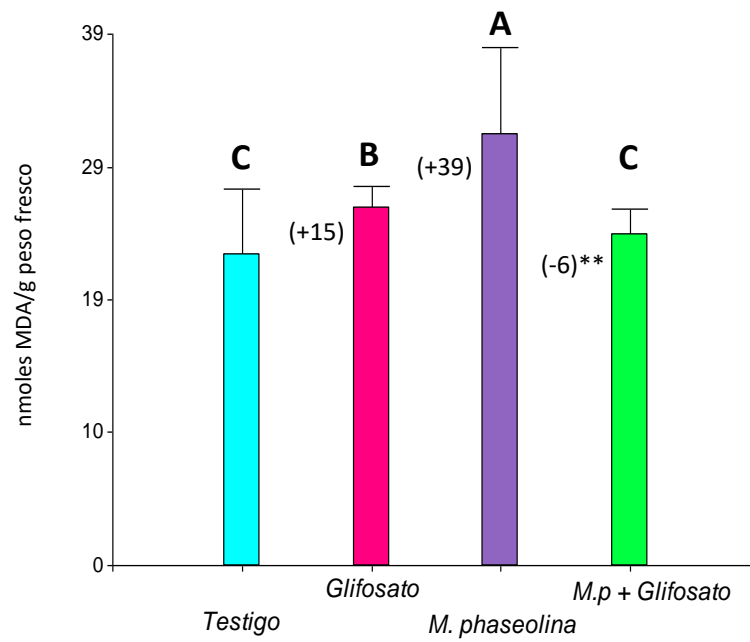
En este caso la triple interacción de los factores: *M. phaseolina* – glifosato – Phi Mn no fue significativa (Fig. 4.11). En cambio, las interacciones: *M. phaseolina*-glifosato y glifosato-Phi Mn, sí lo fueron.

Para la interacción *M. phaseolina*-glifosato, los tratamientos que contenían *M. phaseolina* sin glifosato fueron, en promedio, los de mayor contenido de TBARS significativamente, con un 39% más que los tratamientos que no contenían al hongo (Fig. 4.11, (1)). Los tratamientos que contenían *M. phaseolina* y glifosato, no se diferenciaron estadísticamente de aquellos que no contenían ninguno de estos factores. Sin embargo, los tratamientos que contenían el patógeno y el herbicida mostraron una reducción del 6% del contenido de TBARS con respecto a los tratamientos que contenían *M. phaseolina* sin glifosato (Fig. 4.11, (1)).

En el caso de la interacción significativa glifosato-Phi Mn, los tratamientos que no contenían ni el herbicida ni el Phi resultaron ser los de mayor contenido de TBARS (Fig. 4.11, (2)). Es importante destacar que dentro de este tratamiento se engloba a los testigos absolutos (sanos) y los testigos inoculados con *M. phaseolina*. De esta manera, es coherente con lo que se observó anteriormente para la interacción (*M. phaseolina*-glifosato).

Los tratamientos que contenían Phi Mn sólo, fueron los que presentaron significativamente el menor contenido de TBARS ($p < 0,05$) con una reducción del 31% con respecto a los testigos (Fig. 4.11 (2)).

1)



2)

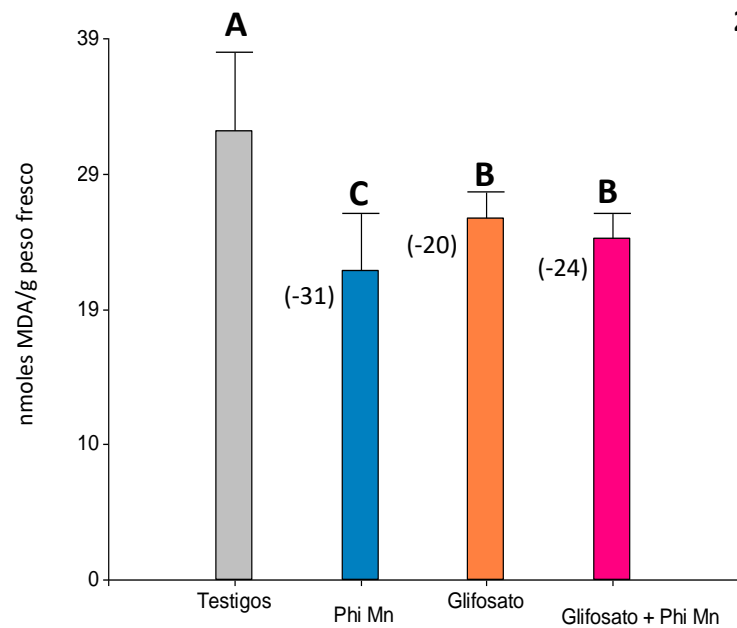


Figura 4.11 Contenido medio de TBARS en hojas de soja, 7 días después la aplicación de los tratamientos. Se presentan las únicas interacciones entre factores que resultaron significativas: *M. phaseolina*-glifosato (1) y glifosato-Phi Mn (2). Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas al 5% (Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de TBARS para los distintos tratamientos, respecto de los testigos sanos y testigos inoculados (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)

4.3.2.1.2- Contenido de GSH

Para GSH, la triple interacción entre los factores resultó significativa (Fig. 4.12). En este caso el mayor contenido ($p < 0,05$) se observó para el tratamiento M.p + Phi Mn con un incremento del 25% respecto del testigo inoculado (Fig. 4.12). El tratamiento M.p + glifosato no difirió significativamente del testigo inoculado.

Para los casos no inoculados, en todos los tratamientos se observó un contenido significativamente menor de GSH que en el testigo absoluto (sano) (Fig. 4.12). Los tratamientos Phi Mn y glifosato + Phi Mn no mostraron diferencias significativas entre sí. El tratamiento de glifosato sólo, redujo en un 18% el contenido de GSH con respecto del testigo no inoculado (Fig. 4.12).

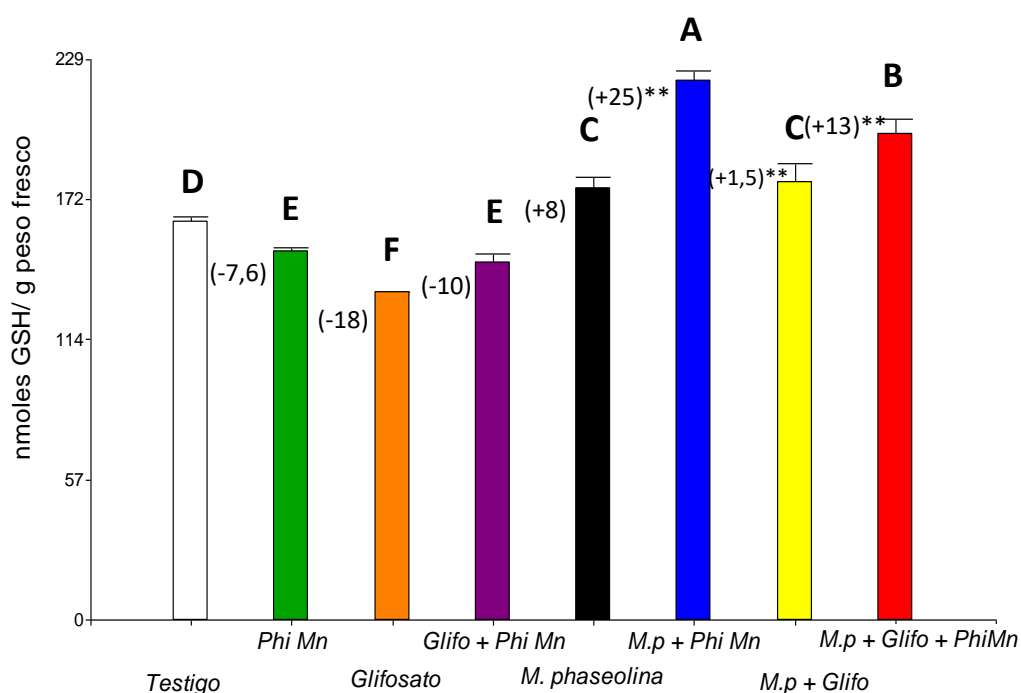


Figura 4.12 Contenido medio de GSH en hojas de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican % de variación del contenido de GSH para los distintos tratamientos, con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

4.3.2.1.3- Actividad de las enzimas antioxidantes

La mayor actividad de CAT en hojas, 7 DDA, se observó para el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.13, (1)) con un incremento de la actividad de un 228% con respecto al testigo inoculado (*M. phaseolina*) (Tabla 4.3). El tratamiento M.p + glifosato fue el tratamiento inoculado con menor actividad de CAT significativamente (Fig. 4.13, (1)). Éste redujo la actividad enzimática de CAT en un 37% en relación al testigo inoculado (Tabla 4.3).

Con respecto a los tratamientos sanos, el Phi Mn demostró la mayor actividad CAT con un incremento de 252% respecto del testigo sano (Tabla 4.3). Finalmente, el tratamiento que presentó la menor actividad de CAT fue el del glifosato sólo. Éste no mostró diferencias significativas con el tratamiento M.p + glifosato ni con el tratamiento testigo sano (Fig. 4.13, (1)).

En lo que respecta a la enzima GR, el tratamiento que presentó la mayor actividad de forma significativa fue *M. phaseolina* (Fig. 4.13, (2)), con un incremento del 55% respecto del testigo sano (Tabla 4.3). De los tratamientos inoculados, el de menor actividad fue M.p + glifosato con una reducción del 69% de la actividad de la enzima en comparación al testigo inoculado. Sin embargo, dicho tratamiento no difirió significativamente de M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.13, (2)).

La actividad de GR de los tratamientos no inoculados en todos los casos se ubicó por debajo del testigo (Fig. 4.13, (2)). El tratamiento glifosato + Phi Mn fue el de menor actividad GR y no hubo diferencias significativas con el tratamiento M.p + Phi Mn (Tabla 4.3).

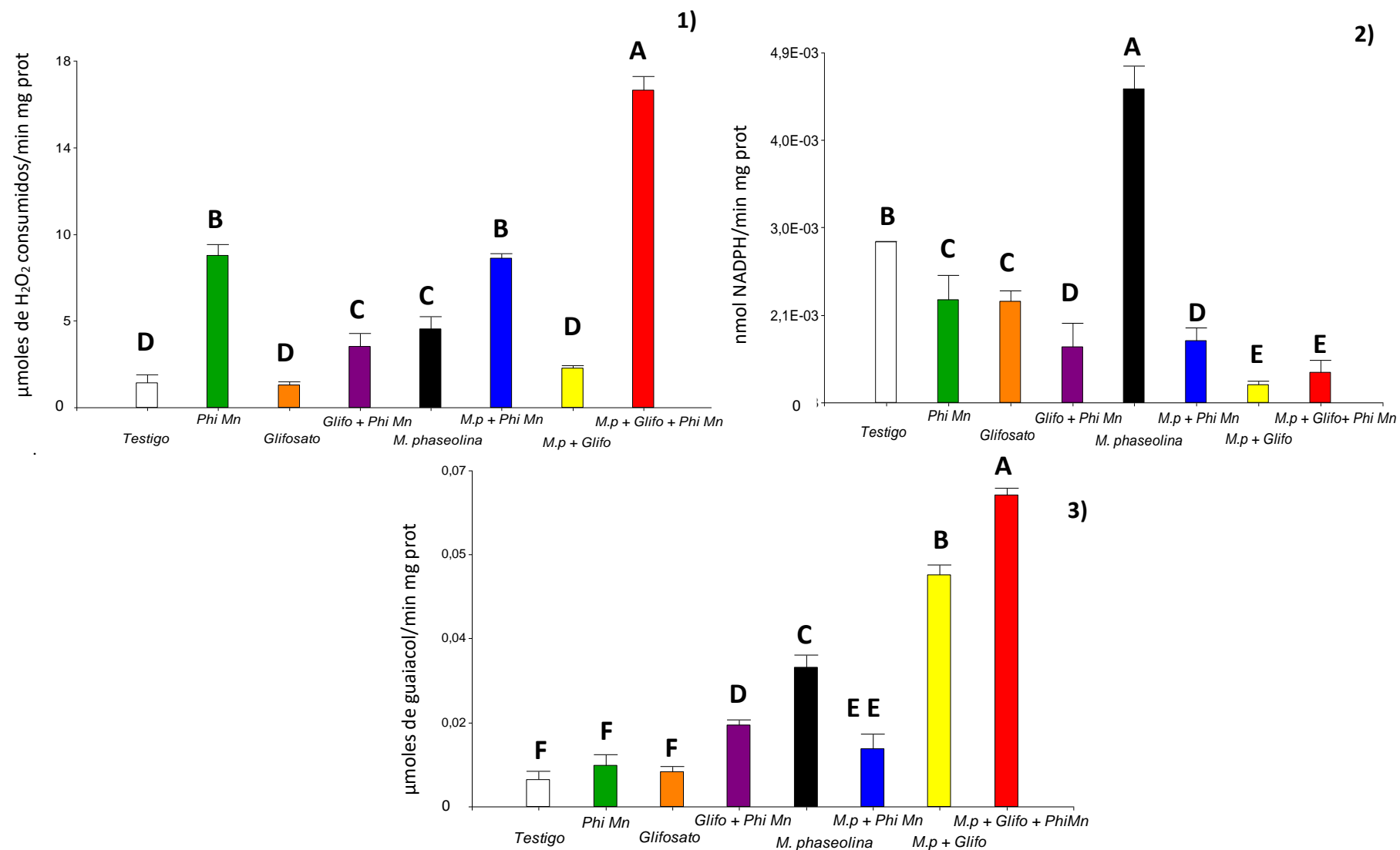


Figura 4.13 Actividad media de las enzimas antioxidantes CAT (1), GR (2) y GPOX (3) medidas en hojas de plantas de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

Enzima	CAT	GR	GPOX
Tratamiento			
Testigo	-	-	-
glifosato	-3,72	-20,69	+25
Phi Mn	+252,48	-20,69	+37,5
glifo + Phi Mn	+54,04	-37,93	+150
M. phaseolina	+84,19	+55,17	+300
M.p + glifosato	-37,33**	-68,88**	+59,37**
M.p + Phi Mn	+67,66**	-57,77**	-53,12**
M.p + glifo + Phi Mn	+228,34**	-66,66**	+109,37**

Tabla 4.3 Diferencias porcentuales de la actividad de las enzimas CAT, GR y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para hojas de soja, 7 días después de la inoculación. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

En el caso de la enzima GPOX, la mayor actividad se detectó para el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.13, (3)). Este tratamiento generó un incremento del 109% de la actividad de la enzima respecto del testigo inoculado (Tabla 4.3). El tratamiento M.p + Phi Mn generó una disminución significativa de la actividad GPOX de un 53% en relación al testigo inoculado (Fig. 4.13, (3) y Tabla 4.3).

Los tratamientos con Phi Mn y glifosato sólo, no difirieron del testigo absoluto (sano) (Fig. 4.13, (3)); mientras que la mezcla de glifosato + Phi Mn, sí (+150%, Tabla 4.3).

4.3.2.1.4- Actividad de las enzimas de defensa

La actividad de PAL fue significativamente mayor para el tratamiento M.p + Phi Mn (Fig. 4.14, (1)) con un 208% más de actividad que el testigo inoculado (*M. phaseolina*) (Tabla 4.4). El tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn resultó no diferir del testigo inoculado (Fig. 4.14, (1)). Mientras que la menor actividad de PAL se detectó para M.p + glifosato (Fig. 4.14,(1)), con una disminución del 55% de la actividad respecto del testigo inoculado (Tabla 4.4).

El tratamiento de Phi Mn sólo, mostró un aumento significativo de 10% en la actividad con respecto al testigo absoluto (sano) (Tabla 4.4). Finalmente, de los tratamientos no tratados con el patógeno, el de menor actividad enzimática significativa fue la mezcla de glifosato + Phi Mn (-39%) (Fig. 4.14, (1) y Tabla 4.4).

Con respecto a la enzima PPO, la mayor actividad se observó para M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.14, (2)). Este tratamiento presentó un incremento de la actividad de la enzima del 12% con respecto al testigo inoculado (Tabla 4.4). No obstante, ese incremento no fue estadísticamente significativo.

El tratamiento M.p + glifosato generó una merma significativa de la actividad con respecto del testigo inoculado, del 12% (Tabla 4.4). Así también lo hizo el tratamiento M.p + Phi Mn, pero de forma más marcada (-30%) (Figura 4.14, (2); Tabla 4.4). Éste último no se diferenció de los tratamientos glifosato y glifosato+Phi Mn.

Enzima	PAL	PPO	β 1, 3 glucanasa
Tratamiento			
Testigo	-	-	-
glifosato	-14,51	-30,55	+6,42
Phi Mn	+10,34	-2,77	+22,01
glifo + Phi Mn	-38,60	-33,33	+13,76
M. phaseolina	-16,06	-8,33	+3,67
M.p + glifosato	-55,22**	-12,12**	-17,69**
M.p + Phi Mn	+208,18**	-30,30**	+9,73**
M.p + glifo + Phi Mn	+3,20**	+12,12**	+14,16**

Tabla 4.4 Diferencias porcentuales de la actividad de las enzimas PAL, PPO y β 1,3 glucanasa para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) en hojas de soja, 7 días después de la aplicación. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

Los tratamientos Phi Mn, glifosato + Phi Mn, M.p + Phi Mn y M.p + glifosato + Phi Mn presentaron la mayor actividad de β 1,3 glucanasa y no fueron estadísticamente distintos entre sí (Fig. 4.14,(3)). El Phi Mn generó un incremento de la actividad con respecto al testigo sano de un 22% (Tabla 4.4). Por último, M.p + glifosato demostró tener la menor actividad de β 1,3 glucanasa con un 18% menos que el testigo inoculado (Fig. 4.14, (3); Tabla 4.4).

En el caso de la actividad de LOX, la única interacción significativa fue la de glifosato-Phi Mn. Los datos de esta enzima fueron transformados mediante raíz cuadrada para cumplir con los supuestos del ANOVA.

En este caso, la mayor actividad se detectó para aquellos tratamientos que incluían glifosato en combinación con Phi Mn, aunque no se diferenciaron de los testigos (Fig. 4.14, (4)). La menor actividad de LOX se observó para aquellos tratamientos que contenían glifosato sin Phi Mn, con una reducción de la actividad del 31% (Fig. 4.14, (4)).

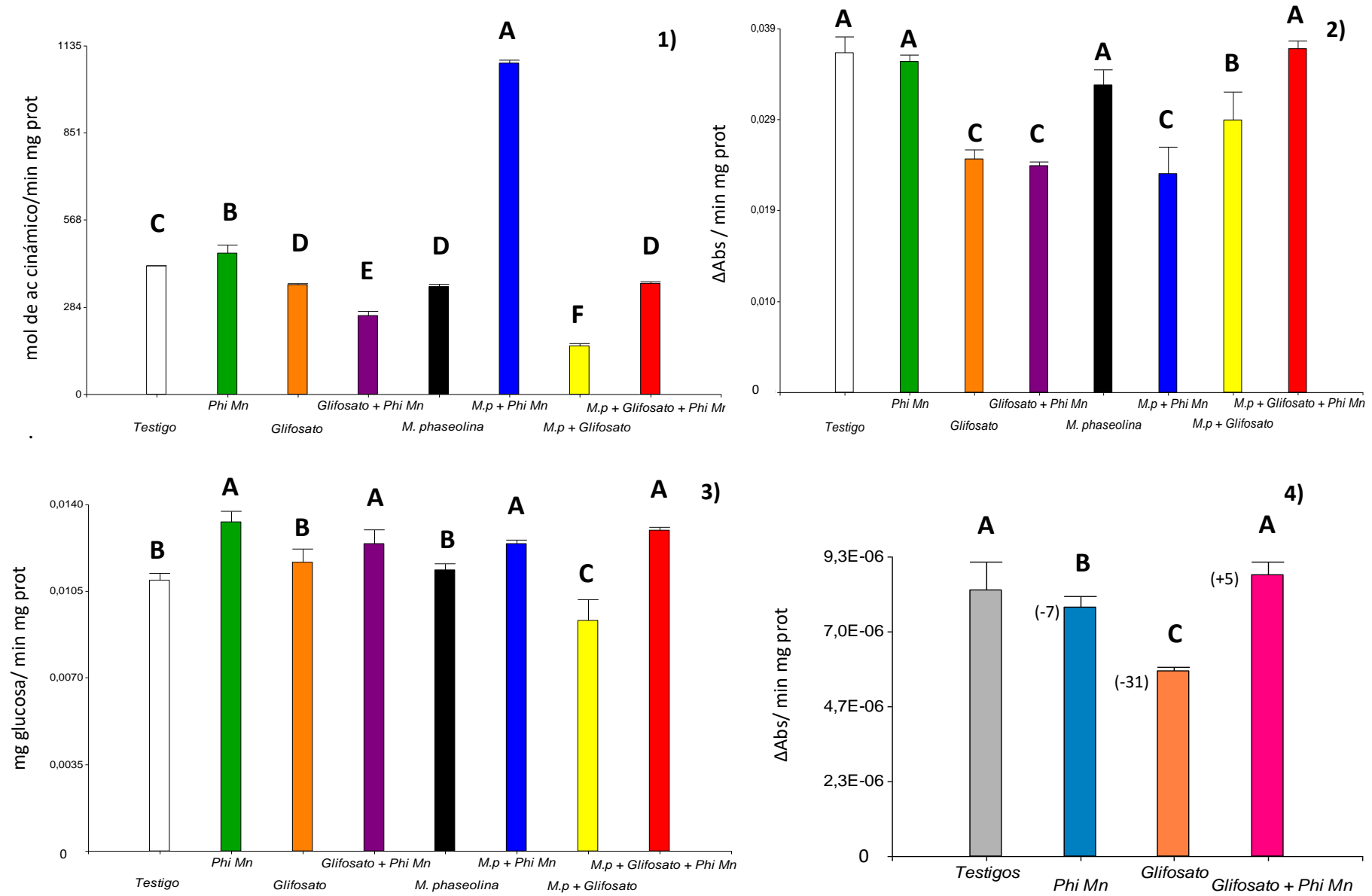


Figura 4.14 Actividad media de las enzimas PAL (1), PPO (2), β 1,3 glucanasa (3) y LOX (4) en hojas de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Para LOX se muestra la única interacción entre factores que resultó significativa: glifosato- Phi Mn. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan el % de variación de la actividad de cada enzima para los distintos tratamientos vs los testigos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

4.3.2.2- Treinta y siete días desde aplicación (37 DDA)

4.3.2.2.1- Contenido de TBARS

El contenido de TBARS no se diferenció estadísticamente entre los tratamientos glifosato, *M. phaseolina*, M.p + Phi Mn y M.p + glifosato (Fig. 4.15). Éstos presentaron el mayor contenido de TBARS, siendo el glifosato (+21%) y *M. phaseolina* (+27%) los de mayor incremento con respecto al testigo sano.

El Phi Mn, presentó una reducción significativa del contenido de TBARS con respecto al testigo (-11%). M.p + glifosato + Phi Mn generó el mínimo contenido de estas sustancias, con una disminución del 44% respecto del testigo inoculado (Fig. 4.15).

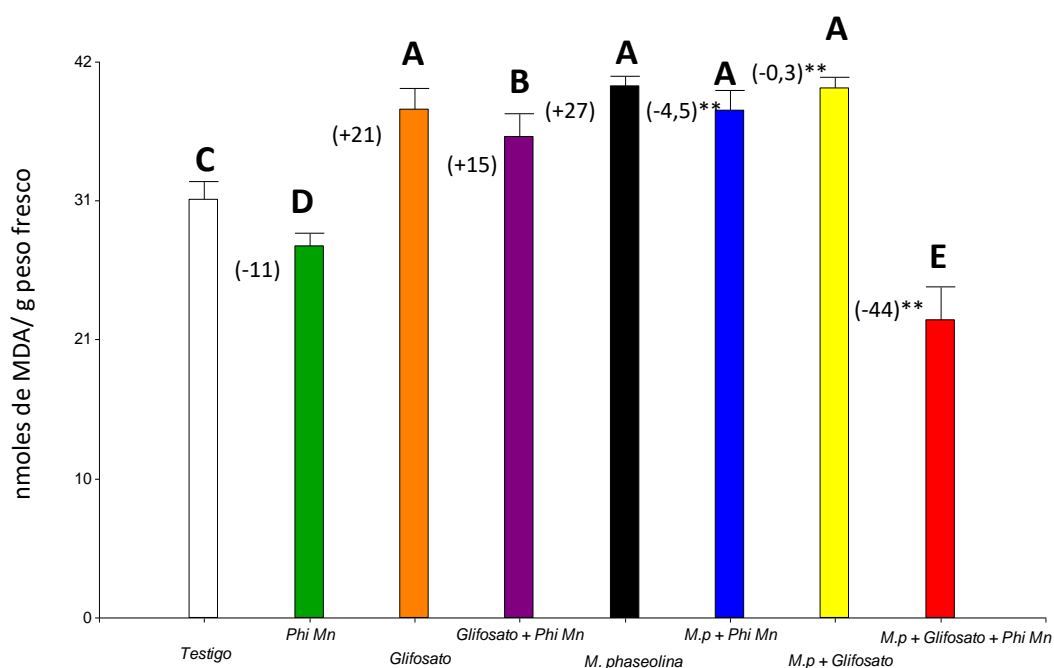


Figura 4.15 Contenido promedio de TBARS en hojas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de TBARS para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)

4.3.2.2.2- Contenido de GSH

El mayor contenido de GSH se observó para glifosato, glifosato + Phi Mn, *M. phaseolina*, M.p + Phi Mn y M.p + glifosato (Fig. 4.16). Estos tratamientos no difirieron estadísticamente entre sí. Sin embargo, se diferenciaron estadísticamente del testigo sano con incrementos en el contenido de GSH de hasta el 91% para *M. phaseolina* (Fig. 4.16). Los tratamientos Phi Mn y M.p + glifosato + Phi Mn no se distinguieron entre sí y presentaron los menores contenidos de GSH.

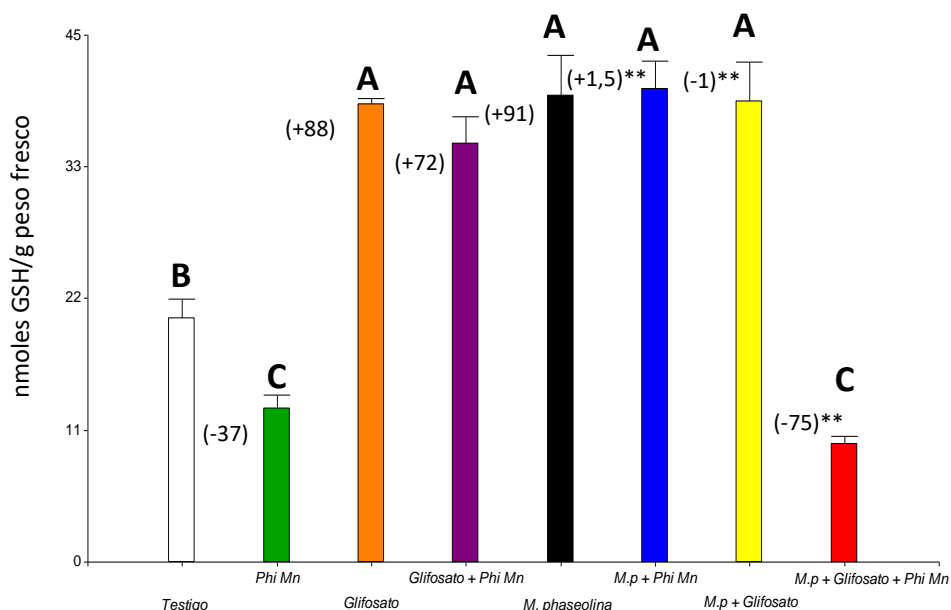


Figura 4.16 Contenido medio de GSH en hojas soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de GSH para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)

4.3.2.2.3- Actividad de las enzimas antioxidantes

La actividad de CAT fue significativamente mayor para M.p + Phi Mn (Fig. 4.17, (1)), con un incremento de la actividad del 217% por encima del testigo inoculado (Tabla 4.5).

En los tratamientos no inoculados, el que demostró la mayor actividad fue el Phi Mn con un 44% más de actividad que el testigo sano (Fig. 4.17, (1); Tabla 4.5). Los tratamientos glifosato y glifosato + Phi Mn redujeron la actividad de CAT significativamente por debajo del testigo en un 53% y 40% respectivamente, pero no se diferenciaron entre sí (Fig. 4.17, (1); Tabla 4.5).

En el caso de GR la mayor actividad se registró para Phi Mn y *M. phaseolina*, los cuales no se diferenciaron estadísticamente entre sí (Fig. 4.17, (2)). Los demás tratamientos inoculados redujeron la actividad de GR respecto del testigo inoculado y no mostraron ser distintos entre sí. En el caso de los tratamientos no inoculados,

glifosato + Phi Mn fue el de menor actividad de GR, con una disminución de la actividad del 18% (Tabla 4.5).

Contrariamente a lo que se describió anteriormente para la CAT y la GR, la mayor actividad de GPOX se detectó para el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.17, (3)), el cual se destacó estadísticamente de los demás tratamientos y mostró un 27% más de actividad que el testigo inoculado (Tabla 4.5).

En los tratamientos no inoculados, no se detectaron diferencias entre Phi Mn y glifosato, los cuales presentaron mayor actividad que el testigo sano (+58%, en ambos casos) (Fig. 4.17, (3); Tabla 4.5).

Enzima	CAT	GR	GPOX
Tratamiento			
Testigo	-	-	-
glifosato	-53,37	+7,14	+57,89
Phi Mn	+43,94	+60,71	+57,89
glifo + Phi Mn	-40,47	-17,85	+26,31
M. phaseolina	+56,25	+64,28	+110,52
M.p + glifosato	+65,71**	-45,65**	+2,5**
M.p + Phi Mn	+217,40**	-47,82**	-5**
M.p + glifo + Phi Mn	+13,46**	-54,35**	+27,5**

Tabla 4.5 Diferencias porcentuales de la actividad promedio de las enzimas CAT, GR y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para hojas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

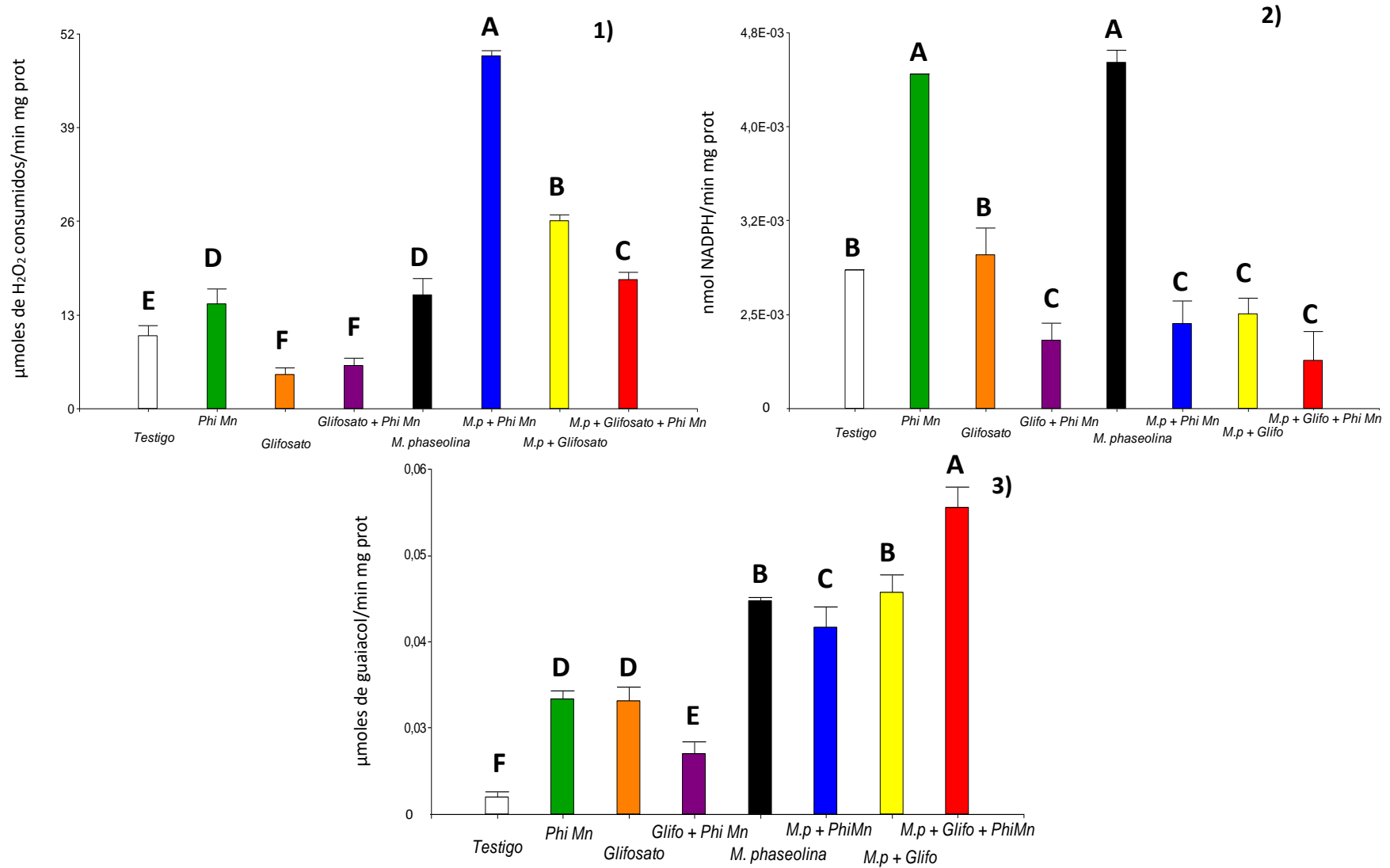


Figura 4.17 Actividad media de las enzimas CAT (1), GR (2) y GPOX (3) en hojas de plantas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

4.3.2.2.4- Actividad de las enzimas de defensa

El tratamiento de glifosato + Phi Mn fue el de mayor actividad de PAL (Fig. 4.18, (1)), 67% más que el testigo no inoculado (Tabla 4.6). No se encontraron diferencias significativas entre este tratamiento y M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.18, (1)). El glifosato generó una disminución significativa de la actividad de PAL respecto del testigo sano (-33%) (Tabla 4.6). La mínima actividad de PAL se registró para el tratamiento M.p + glifosato con un 77% menos de actividad que el testigo inoculado (Fig. 4.18, (1); Tabla 4.6).

Como se observa en la Figura 4.18, (2) y (3), tanto para la PPO como para la β 1,3 glucanasa, la mayor actividad enzimática significativa se determinó para glifosato, seguido del Phi Mn. También para ambas enzimas, la menor actividad se observó para el tratamiento M.p + glifosato (-12% PPO; -58% β 1,3 glucanasa, Tabla 4.6).

Para la actividad de LOX, sólo la interacción glifosato-Phi Mn resultó significativa. Se utilizó una metodología no paramétrica descrita por Scheirer *et al.* (1976) debido a que los supuestos del ANOVA no se cumplían. Se detectó una menor actividad significativa para los tratamientos que contenían la mezcla de glifosato + Phi Mn (Fig. 4.18, (4)).

Enzima	PAL	PPO	β 1, 3 glucanasa
Tratamiento			
Testigo	-	-	-
glifosato	-33,77	+18,75	+33,33
Phi Mn	+52,58	+6,25	+8,33
glifo + Phi Mn	+67,25	-21,87	-25
M. phaseolina	+2,58	-25	0
M.p + glifosato	-76,61**	-12,5**	-58,33**
M.p + Phi Mn	-21,87**	-16,66**	-16,66**
M.p + glifo + Phi Mn	+56,22**	+8,33**	-25**

Tabla 4.6 Diferencias porcentuales de la actividad promedio de las enzimas PAL, PPO y β 1,3 glucanasa para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para hojas de soja, 37 días después de la aplicación. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

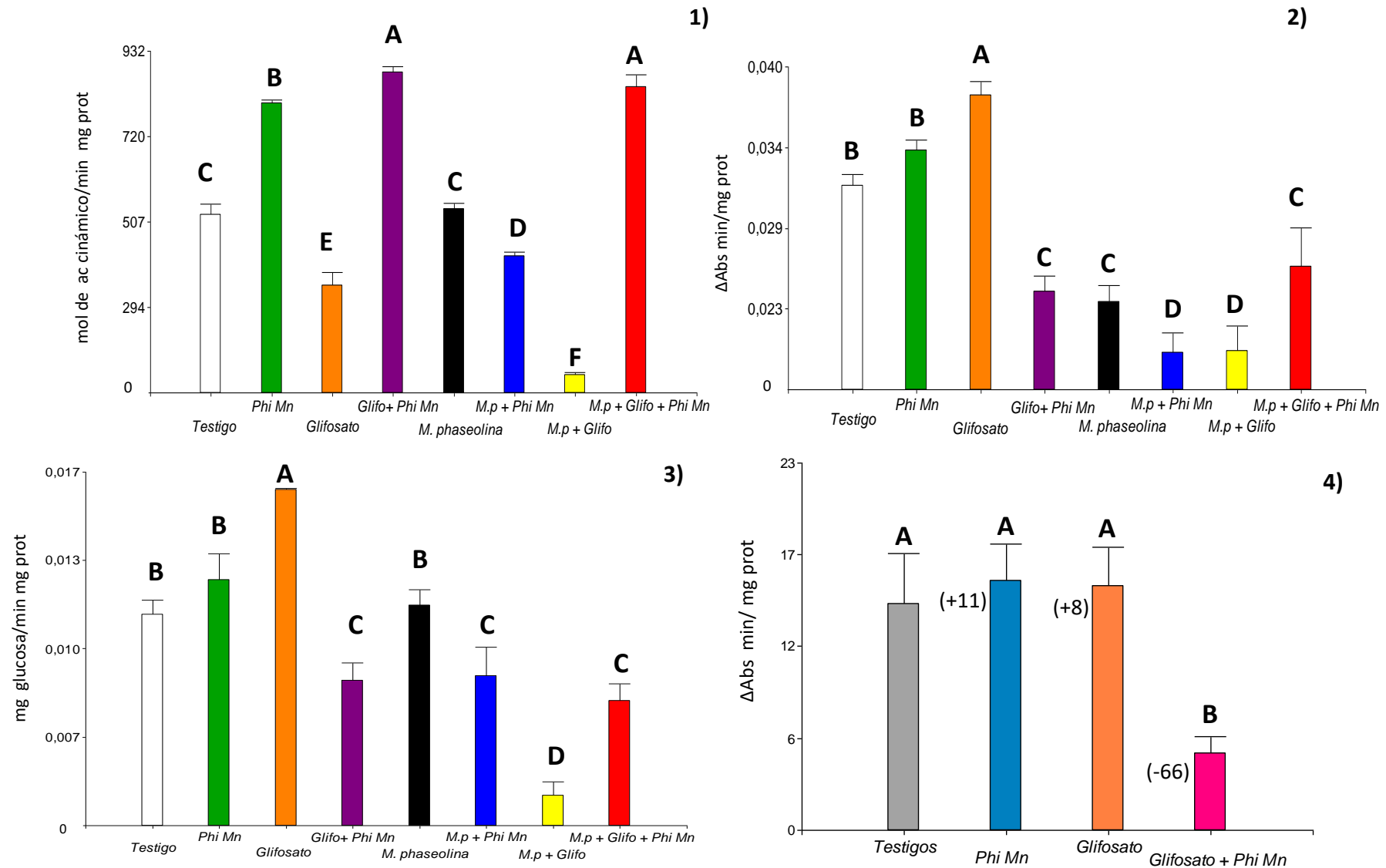


Figura 4.18 Actividad media de las enzimas de defensa PAL (1), PPO (2), β 1,3 glucanasa (3) y LOX (4) en hojas de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. En el caso de LOX (4) se muestra la única interacción entre factores significativa al 5%: glifosato-Phi Mn. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan diferencias porcentuales de la actividad enzimática para los distintos tratamientos vs. los testigos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

4.3.3- Efectos del glifosato y del Phi Mn *in vivo* sobre el estado oxidativo de RAÍCES de soja y de enzimas relacionadas con la defensa

4.3.3.1- Siete días desde aplicación (7 DDA)

4.3.3.1.1- Contenido de TBARS

El contenido de TBARS más importante se observó para el testigo inoculado (*M. phaseolina*) (Fig. 4.19). Dentro de los tratamientos inoculados el de menor peroxidación lipídica fue M.p + glifo + Phi Mn (-28% respecto del testigo inoculado). El glifosato se ubicó por debajo del testigo inoculado y fue el tratamiento no inoculado con mayor contenido de TBARS, con un 51% más que el testigo sano (Fig. 4.19).

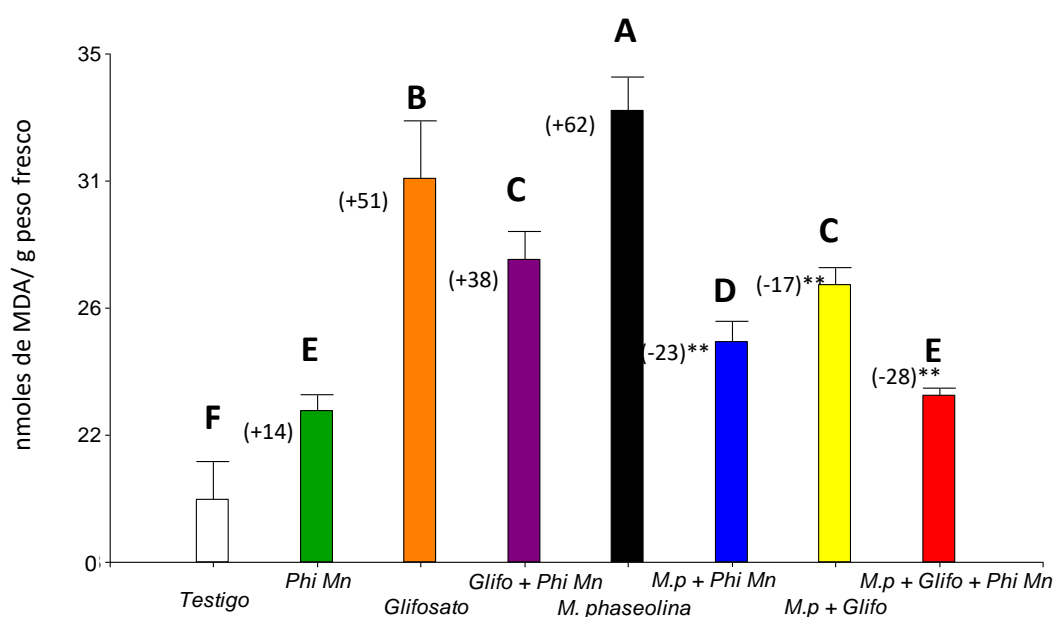


Figura 4.19 Contenido medio de TBARS en muestras de raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis indican diferencias porcentuales del contenido de TBARS para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

4.3.3.1.2- Contenido de GSH

En lo que se refiere a GSH, M.p + glifosato mostró el contenido más alto de forma significativa (+30% que el testigo inoculado; Fig. 4.20). Los tratamientos M.p + Phi Mn y M.p + glifosato + Phi Mn mostraron el menor contenido de GSH y no se diferenciaron significativamente entre sí (Fig. 4.20).

Todos los tratamientos no inoculados presentaron significativamente un menor contenido de GSH que el testigo absoluto, y el mínimo se registró para Phi Mn (Fig. 4.20).

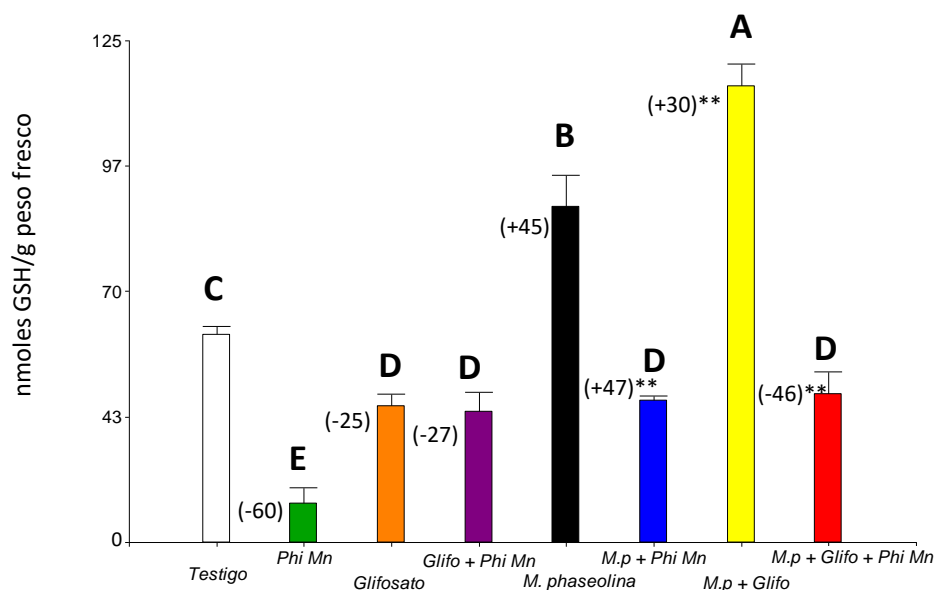


Figura 4.20 Contenido medio de GSH en muestras de raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras sobre las columnas corresponden al desvío estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan diferencias porcentuales del contenido de GSH para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

4.3.3.1.3- Actividad de las enzimas antioxidantes

En cuanto a la actividad de CAT, sólo los factores *M. phaseolina* y Phi Mn resultaron significativos al 5% (Fig. 4.21). Los datos de CAT fueron analizados mediante metodología no paramétrica descripta por Scheirer *et al.* (1976), debido a que los supuestos del ANOVA no se cumplían. Para el caso del factor *M. phaseolina*, la actividad enzimática resultó mayor en ausencia del patógeno (Fig. 4.21, (1)). En lo que se refiere al factor Phi Mn, la presencia del mismo generó un aumento significativo (+47%) de la actividad de CAT comparado con los tratamientos que no contenían Phi Mn (Fig. 4.21, (2)).

Tanto para la GR como para la GPOX la actividad enzimática fue superior para el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.21,(3) y (4)). En el caso de GR, dicho tratamiento fue seguido por M.p + Phi Mn que también demostró un incremento significativo de la actividad con respecto al testigo inoculado (+74%) (Tabla 4.7). El

glifosato presentó la actividad más alta de forma significativa en los tratamientos no inoculados, seguido del Phi Mn y el glifosato + Phi Mn (Fig. 4.21, (3)).

El caso de GPOX fue similar, M.p + Phi Mn y M.p + glifosato generaron un aumento de la actividad frente al testigo pero ese aumento fue menor que el generado por M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.21, (4)).

El glifosato registró la menor actividad GPOX de todos los tratamientos, de forma significativa (Fig. 4.21, (4)) con una reducción del 42% (Tabla 4.7).

Enzima	GR	GPOX
Tratamiento		
Testigo	-	-
glifosato	+315,38	-41,66
Phi Mn	+192,31	+8,33
glifo + Phi Mn	+153,84	+41,66
M. phaseolina	+284,61	+75
M.p + glifosato	+14**	+33,33**
M.p + Phi Mn	+74**	+23,81**
M.p + glifo + Phi Mn	+140**	+66,66**

Tabla 4.7 Diferencias porcentuales de la actividad media de las enzimas GR y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

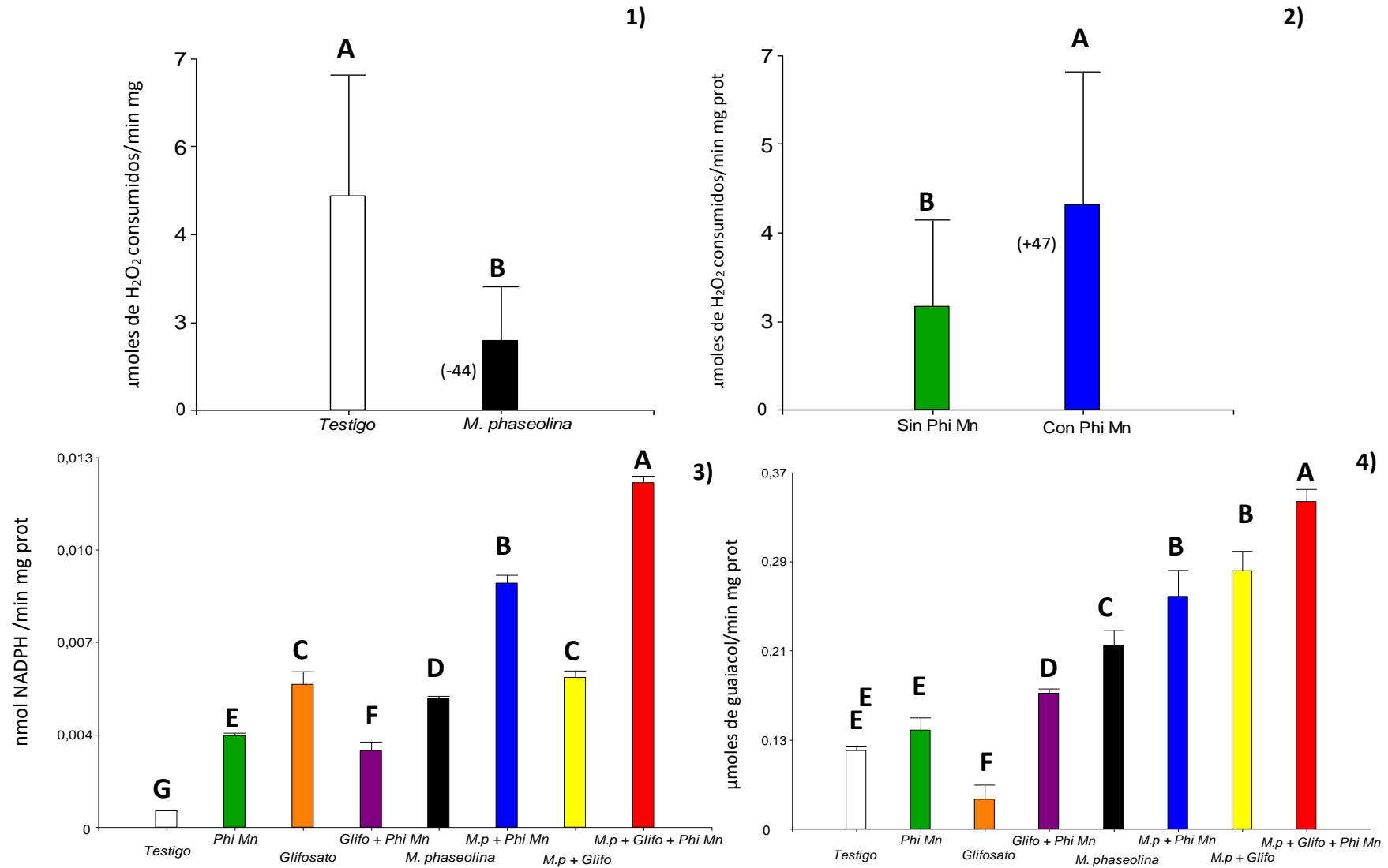


Figura 4.21 Actividad media para las enzimas antioxidantes CAT (1) y (2), GR (3) y GPOX (4) en raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. En el caso de CAT se muestran los factores que resultaron significativos: *M. phaseolina* (1) y Phi Mn (2). Las barras indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan diferencias porcentuales de la actividad de CAT entre los distintos tratamientos. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

4.3.3.1.4- Actividad de las enzimas de defensa

La inducción más importante de la enzima PAL en raíces 7 DDA, se registró para el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.22, (1)). Este tratamiento provocó un incremento del 407% de la actividad de PAL en relación al testigo inoculado (Tabla 4.8). El tratamiento M.p + Phi Mn también generó un aumento significativo del 136% sobre el testigo inoculado (Tabla 4.8).

De los tratamientos no inoculados, el Phi Mn indujo la actividad enzimática en un 69% respecto del testigo sano. En cambio, el glifosato presentó la menor actividad de PAL de todos los tratamientos probados, significativamente (-40%) (Fig. 4.22, (1); Tabla 4.8). Los datos se transformaron mediante raíz cuadrada para cumplir los supuestos del ANOVA.

Nuevamente, para la PPO y la β 1,3 glucanasa la mayor inducción significativa se registró en el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.22, (2) y (3)); con un 30% y un 22% más de actividad que el testigo inoculado, para la PPO y la β 1,3 glucanasa respectivamente (Tabla 4.8).

Enzima	PAL	PPO	β 1, 3 glucanasa	LOX
Tratamiento				
Testigo	-	-	-	-
glifosato	-40,29	-13,21	+32,43	-45
Phi Mn	+68,68	+1,88	+6,75	-57,5
glifo + Phi Mn	-2,63	-25,52	+28,37	-35
M. phaseolina	+12,68	-5,66	+29,72	+25
M.p + glifosato	+70,40**	+6**	-2,08**	+20**
M.p + Phi Mn	+135,68**	+2**	-10,42**	-12**
M.p + glifo + Phi Mn	+407,07**	+30**	+21,87**	-48**

Tabla 4.8 Diferencias porcentuales de la actividad media de las enzimas PAL, PPO, β 1,3 glucanasa y LOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 7 días después de la aplicación. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

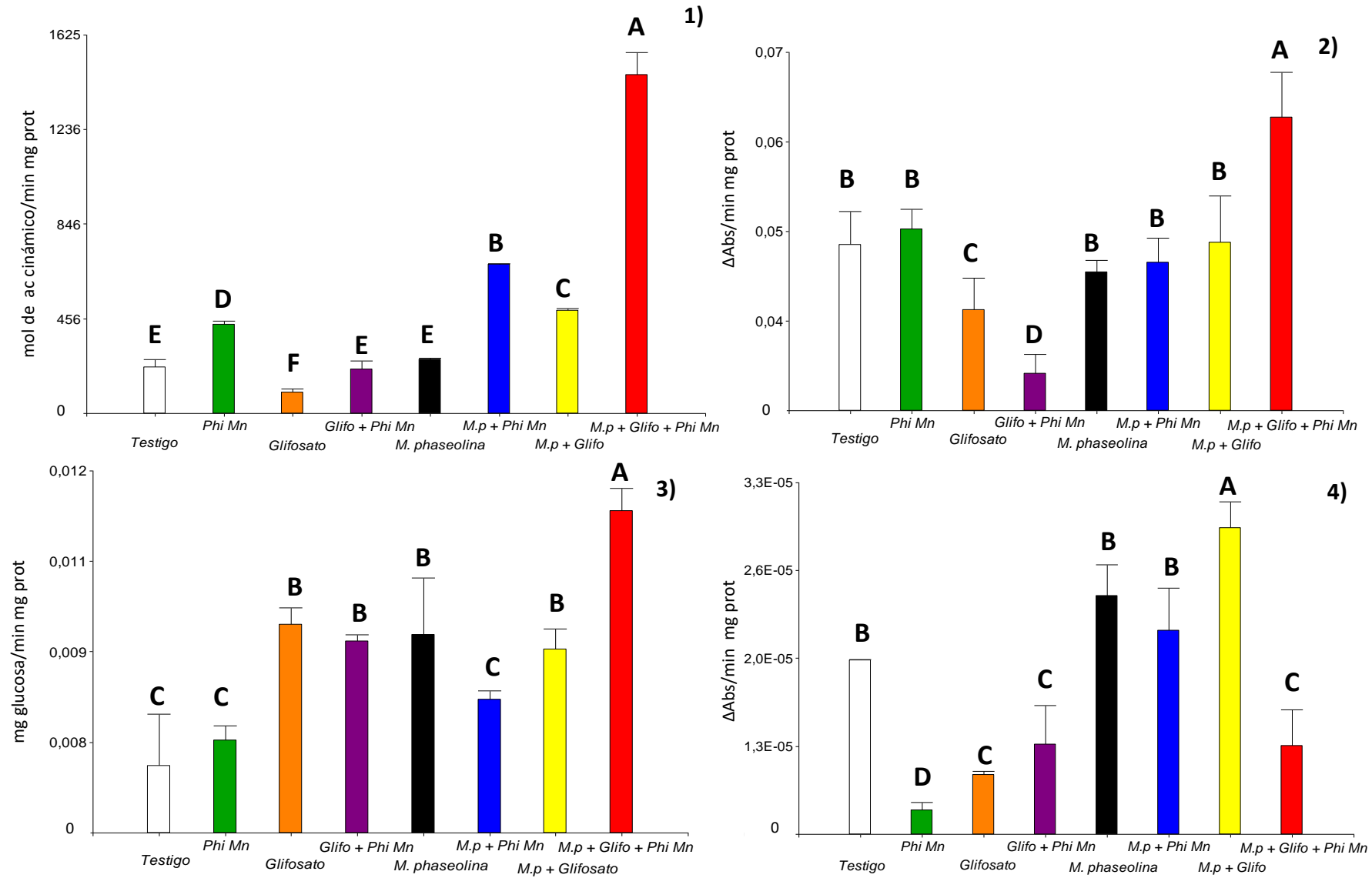


Figura 4.22 Actividad de las enzimas PAL (1), PPO (2), β 1,3 glucanasa (3) y LOX (4) en raíces de soja, 7 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

En el caso de PPO, la mínima inducción significativa se registró para el tratamiento glifosato + Phi Mn. Los tratamientos M.p + Phi Mn, M.p + glifosato y Phi Mn no se diferenciaron de los testigos (Fig. 4.22, (2)).

La actividad de β 1,3 glucanasa no difirió significativamente entre los tratamientos, glifosato, glifosato + Phi Mn, M.p + glifosato y testigo inoculado (Fig. 4.22, (3)). La menor actividad se observó para los tratamientos Phi Mn y M.p + Phi Mn, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí ni con el testigo (Fig. 4.22, (3)).

La actividad enzimática de LOX tuvo su pico para el tratamiento M.p + glifosato. Contrariamente a la tendencia que se venía manifestando en las enzimas anteriores, el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn presentó la menor actividad de LOX de los tratamientos inoculados en forma significativa (Fig. 4.22, (4)). Con respecto a los tratamientos no inoculados, todos se ubicaron por debajo del testigo, con reducciones de la actividad de la enzima de hasta el 57% para Phi Mn (Fig. 4.22, (4); Tabla 4.8). Los datos de la actividad enzimática de LOX se transformaron mediante Log10.

4.3.3.2- Treinta y siete días desde aplicación (37 DDA)

4.3.3.2.1- Contenido de TBARS

Las interacciones que resultaron significativas para TBARS 37 DDA, fueron: *M. phaseolina* – glifosato, glifosato – Phi Mn y *M. phaseolina* – Phi Mn (Fig. 4.23).

En el primer caso, el contenido de TBARS fue significativamente más alto para los tratamientos que contenían al patógeno (*M. phaseolina*) (Fig. 4.23, (1)). En segundo lugar se ubicaron las muestras tratadas con glifosato y con *M. phaseolina* + glifosato. En el segundo caso (Fig. 4.23 (2)), se puede apreciar que los testigos (engloba a los tratamientos testigo sano y al testigo inoculado) poseen el mayor contenido de TBARS de forma significativa. El mínimo se registró para los tratamientos que contenían Phi Mn sin glifosato (Fig. 4.23, (2)).

Para la interacción *M. phaseolina* – Phi Mn el máximo contenido de TBARS de forma significativa se registró para los tratamientos que contenían al hongo (Fig. 4.23, (3)). La menor cantidad, en cambio, se expresó en los tratamientos que contenían tanto al patógeno como al Phi Mn, reduciendo en un 56% el contenido de las sustancias reactivas en relación a los tratamientos que contenían *M. phaseolina* sólo (Fig. 4.23, (3)).

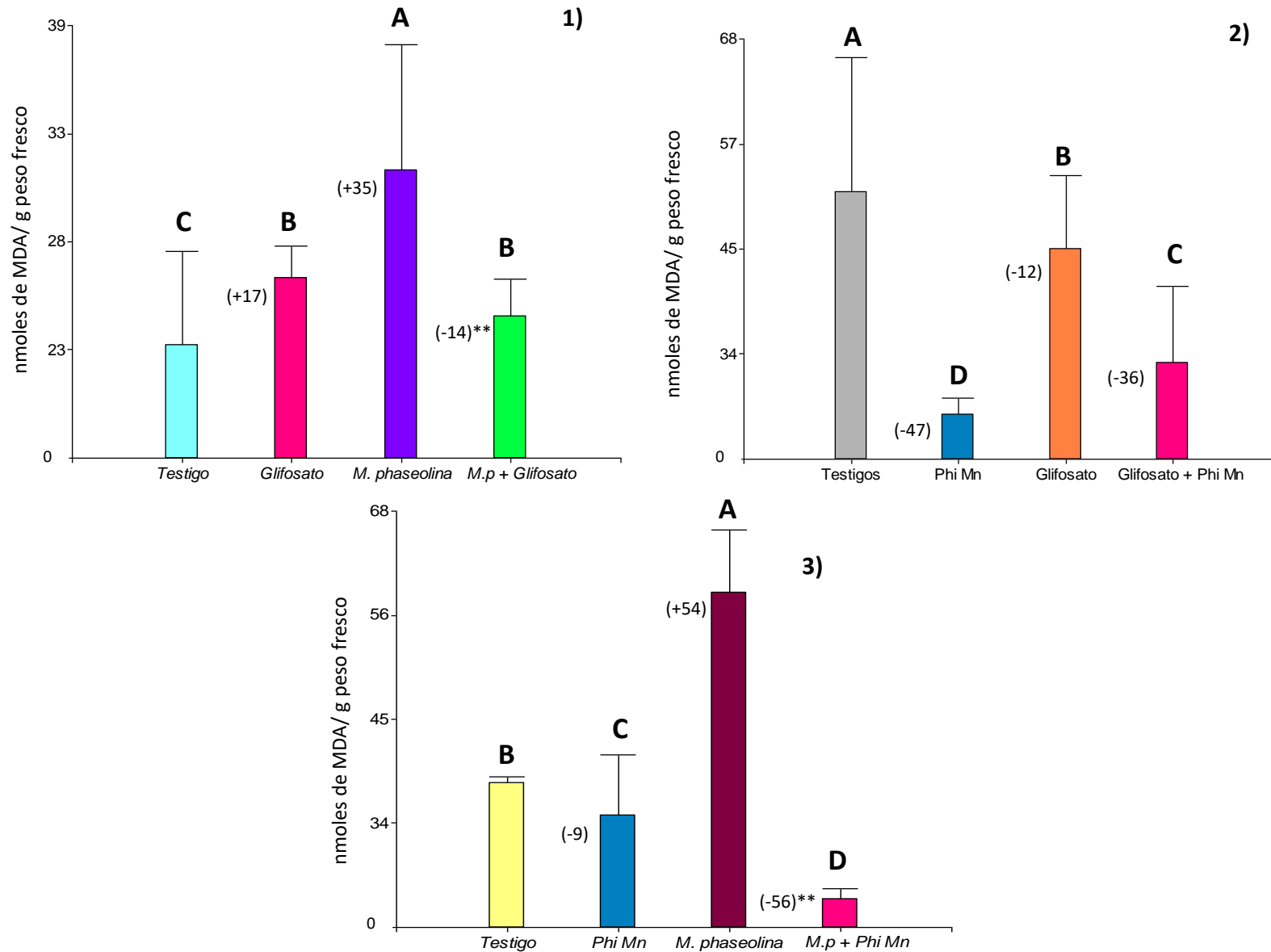


Figura 4.23 Contenido medio de TBARS en raíces de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Sólo se muestran las interacciones significativas entre factores. En el gráfico (1) se observa la interacción *M. phaseolina*-glifosato. En el gráfico (2) se muestra la interacción glifosato-Phi Mn. En el gráfico (3) se presenta la interacción de *M. phaseolina*-Phi Mn. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas al 5% (Test DGC). Los números entre paréntesis representan las diferencias porcentuales del contenido de TBARS con respecto a los testigos y a *M. phaseolina* (**) (*M.p*: *Macrophomina phaseolina*)

4.3.3.2.2- Contenido de GSH

En cuanto al contenido de GSH, los datos debieron ser analizados de acuerdo a la metodología no paramétrica descripta por Scheirer *et al.* (1976). El único factor que resultó significativo fue *M. phaseolina*. Como se puede ver en la Figura 4.24, el tratamiento con el patógeno presentó un contenido de GSH significativamente superior al testigo (+446%).

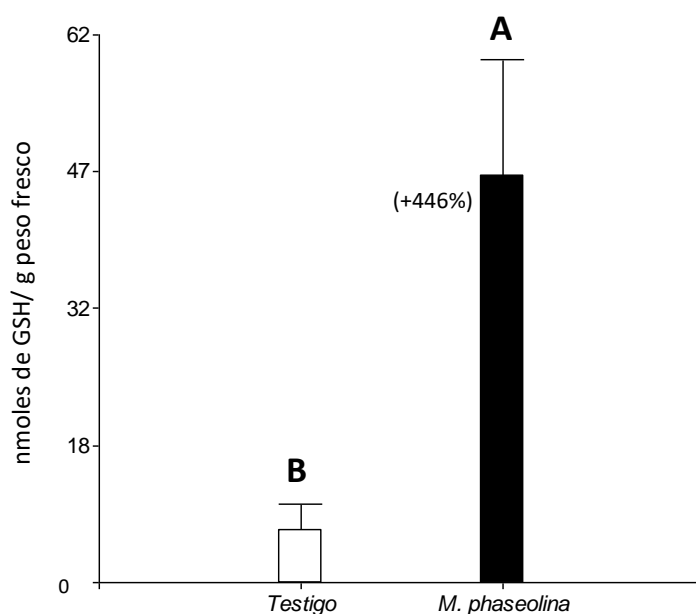


Figura 4.24 Contenido medio de GSH en raíces de soja 37 días después de la aplicación de los tratamientos para el único factor que resultó significativo: *M. phaseolina*. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). El número entre paréntesis representa la diferencia porcentual del contenido medio de GSH respecto del testigo. (M.p: *Macrophomina phaseolina*).

4.3.3.2.3- Actividad de las enzimas antioxidantes

Para la enzima GR, sólo resultó significativo el factor glifosato (Fig. 4.25). En ausencia del herbicida, la actividad enzimática fue significativamente mayor (Fig. 4.25, (2)). La aplicación del glifosato redujo en un 43% la actividad de la enzima comparada con los testigos. Para analizar los datos de esta enzima se utilizó un análisis no paramétrico (Scheirer *et al.*, 1976).

En el caso de CAT, la triple interacción de los factores resultó significativa. La mínima actividad de la enzima se registró para M.p + glifosato, con una reducción del 36% comparado con el testigo inoculado (Fig. 4.25, (1); Tabla 4.9). M.p + glifosato + Phi Mn provocó la máxima inducción de esta enzima con un 871% más de actividad que la registrada para el testigo inoculado (Tabla 4.9). En lo referente a los tratamientos no inoculados, todos se diferenciaron significativamente del testigo, ubicándose por encima de éste (Fig. 4.25, (1)). La mayor diferencia la marcó el glifosato + Phi Mn con un 99% más de actividad de CAT (Tabla 4.9). Los datos de esta enzima se transformaron mediante raíz cuadrada.

Al igual que para CAT, para GPOX se observó una actividad significativamente superior con el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn (Fig. 4.25, (3)). El mismo implicó un aumento de la actividad de un 58% comparado con el testigo inoculado (Tabla 4.9). Mientras que M.p + glifosato mostró la actividad GPOX más pobre de los tratamientos inoculados, con una reducción del 42% comparada al testigo inoculado (Fig. 4.25, (3); Tabla 4.9). Este tratamiento no resultó significativamente distinto del glifosato sólo, el que generó una caída en la actividad del 23% en relación al testigo absoluto (Fig. 4.25, (3); Tabla 4.9).

Enzima	CAT	GPOX
Tratamiento		
Testigo	-	-
glifosato	+33,75	-23,07
Phi Mn	+70,71	+15,38
glifo + Phi Mn	+99,5	+23,07
M. phaseolina	-61,53	+46,15
M.p + glifosato	-36,13**	-42,10**
M.p + Phi Mn	+69,03**	-5,26**
M.p + glifo + Phi Mn	+870,97**	+57,89**

Tabla 4.9 Diferencias porcentuales de la actividad media de las enzimas CAT y GPOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 37 días después de la aplicación. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

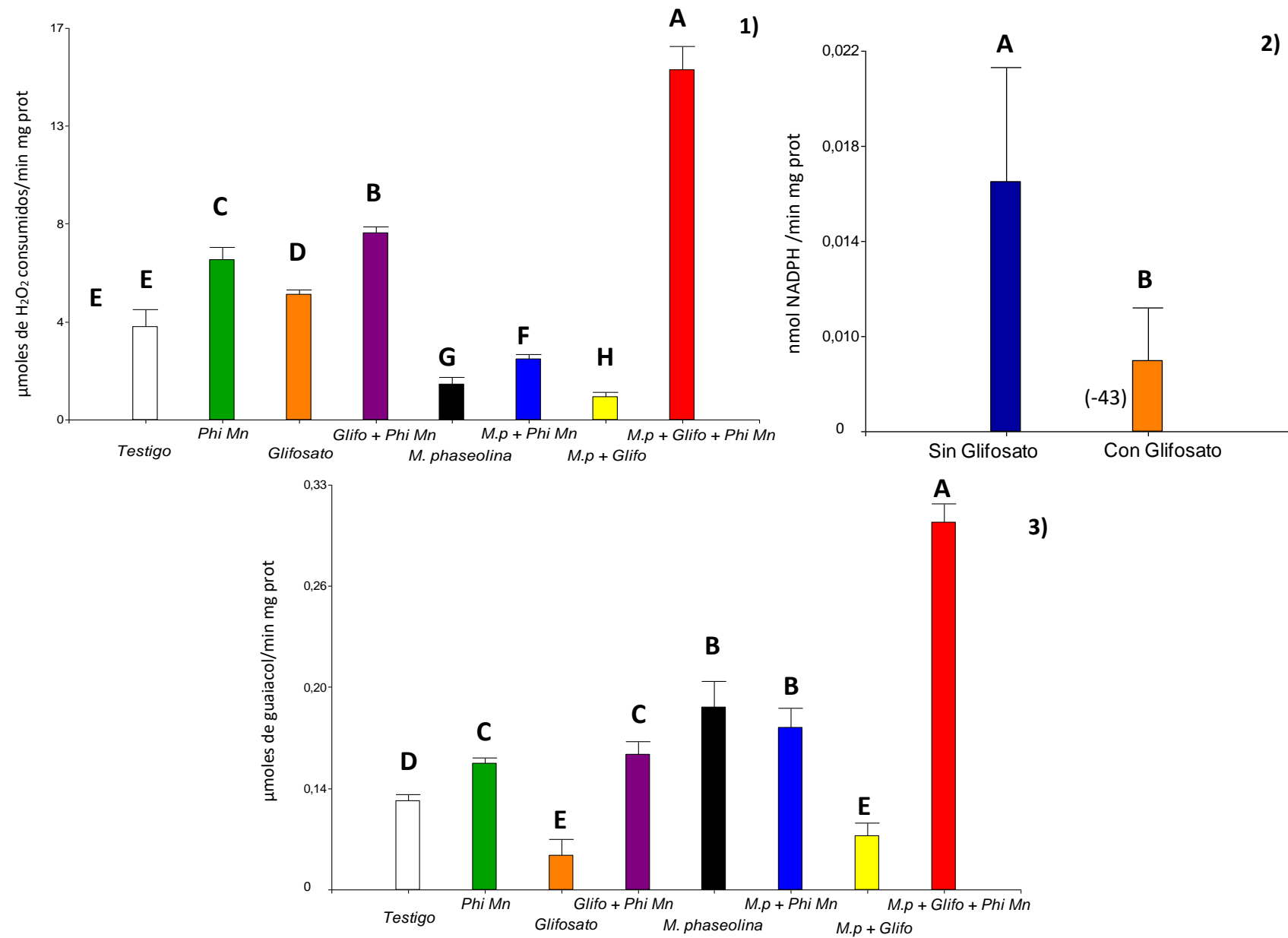


Figura 4.25 Actividad media de las enzimas CAT (1), GR (2) y GPOX (3) en raíces de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). El número entre paréntesis representa el % de variación de la actividad de GR para los tratamientos con glifosato respecto de los que no contenían el herbicida. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

4.3.3.2.4- Actividad de las enzimas de defensa

Para la enzima PAL, la interacción *M. phaseolina*-glifosato fue significativa (5%). Aquí la mínima actividad se observó para los tratamientos que contenían tanto al patógeno como al herbicida (M.p + glifosato) (Fig. 4.26, (1)). Mientras que, la máxima actividad de PAL se detectó en aquellos tratamientos que contenían al herbicida glifosato sin el patógeno (los cuales incluyen a los tratamientos de glifosato sólo y a los de la mezcla glifosato + Phi Mn) (Fig. 4.26, (1)). Para analizar los datos de esta enzima, se llevó a cabo un análisis no paramétrico de acuerdo a Scheirer *et al.* (1976).

En cuanto a la β 1,3 glucanasa, se trabajó con la variable transformada mediante LN. Se encontraron dos interacciones significativas (5%): *M. phaseolina*-Phi Mn y *M. phaseolina*-glifosato. Los resultados se presentan en la Fig. 4.26 (2) y (3).

En ambos casos, la conjunción de los factores que componen la interacción (M.p + Phi Mn por un lado, y M.p + glifosato por otro) presentaron los niveles más bajos de β 1,3 glucanasa (Fig. 4.26, (2) y (3)). Los tratamientos que contenían Phi Mn resultaron los de mayor inducción para la interacción *M. phaseolina*-Phi Mn (Fig. 4.26, (2)). Entretanto que, en el otro caso, los que contenían glifosato fueron los que presentaron la actividad superior (Fig. 4.26, (3)).

Si bien la mayor inducción de la actividad de PPO se observó para el tratamiento Phi Mn (Tabla 4.10), los únicos tratamientos que se diferenciaron estadísticamente del resto fueron M.p + glifosato y M.p + Phi Mn (Fig. 4.27, (1)). Éstos presentaron la menor actividad de PPO y no se diferenciaron significativamente entre sí.

La mezcla de glifosato + Phi Mn generó la máxima actividad para la enzima LOX (Fig. 4.27, (2)). M.p + Phi Mn fue el mejor tratamiento de los inoculados, con un incremento del 75% en relación al testigo inoculado (Tabla 4.10). La mínima actividad de LOX se percibió en el tratamiento Phi Mn (-51% que el testigo) (Fig. 4.27, (2); Tabla 4.10).

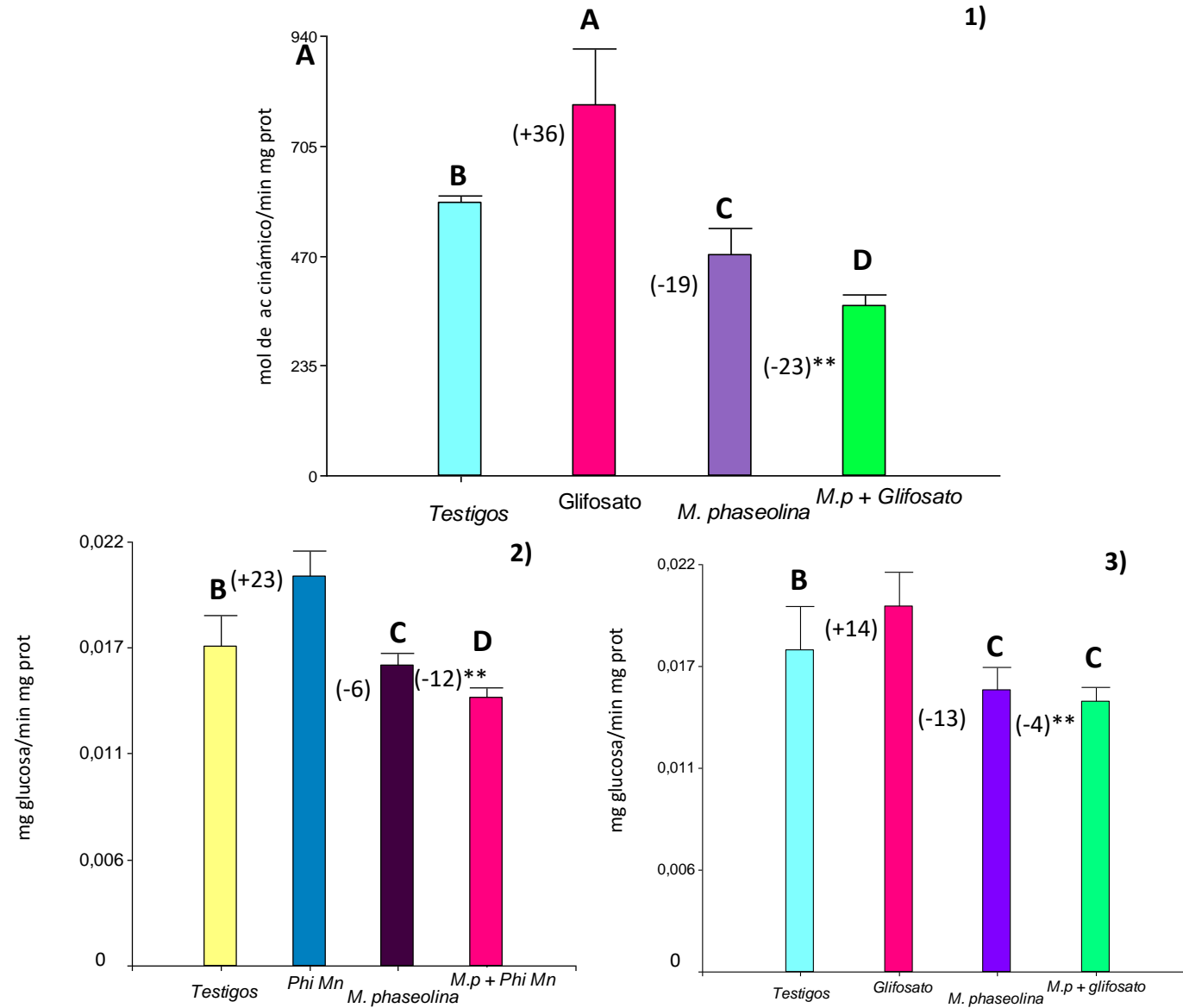


Figura 4.26 Actividad media para las enzimas PAL (1) y β 1,3 glucanasa (2) y (3) en raíces de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Sólo se muestran las interacciones que resultaron significativas. Para la PAL, la interacción de *M. phaseolina* -glifosato (1). Para la β 1,3 glucanasa, las interacciones, *M. phaseolina* -Phi Mn (2) y *M. phaseolina* -glifosato (3). Las barras indican los desvíos estándar de las medias. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). Los números entre paréntesis representan la diferencia porcentual de la actividad de las enzimas para los distintos tratamientos respecto de los testigos y de *M. phaseolina* (**). (M.p: *Macrophomina phaseolina*)

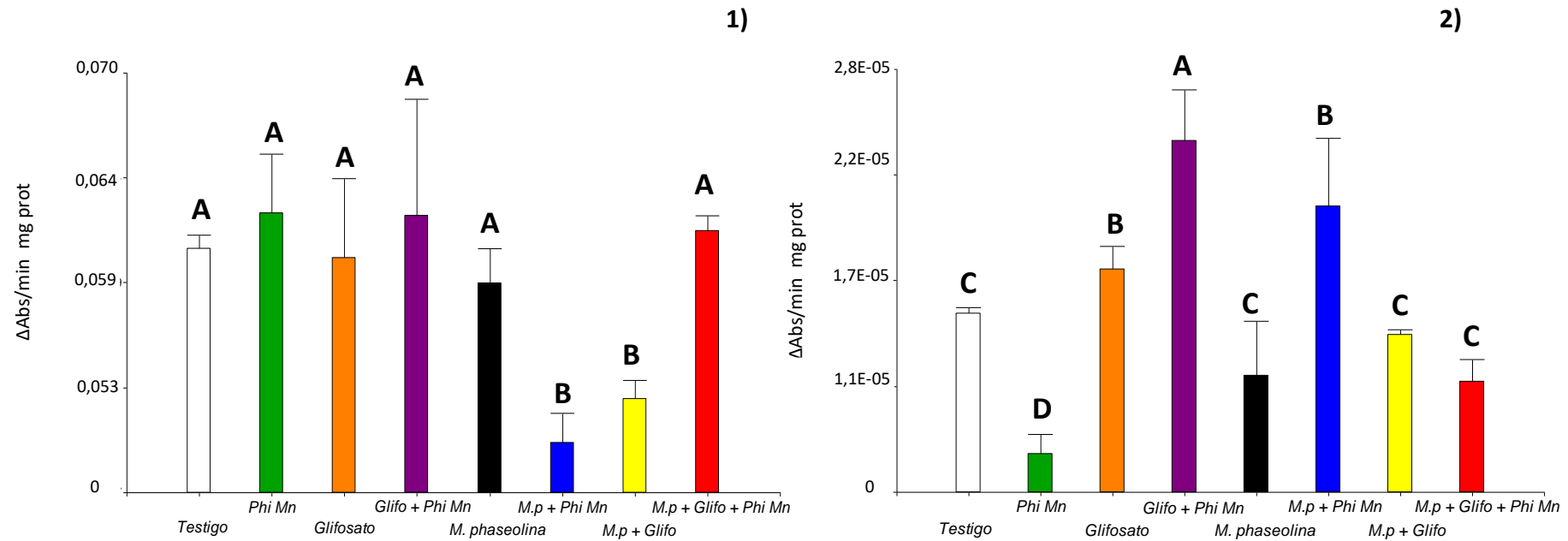


Figura 4.27 Actividad media de las enzimas PPO (1) y LOX (2) en raíces de soja, 37 días después de la aplicación de los tratamientos. Las barras indican los desvíos estándar de la media. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$; Test DGC). (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato)

Enzima	PPO	LOX
Tratamiento		
Testigo	-	-
glifosato	-0,83	+13,33
Phi Mn	+3,14	-51,33
glifo + Phi Mn	+2,98	+60
M. phaseolina	-3,14	-20
M.p + glifosato	-10,76**	+16,66**
M.p + Phi Mn	-15,05**	+75**
M.p + glifo + Phi Mn	+4,95**	-8,33**

Tabla 4.10 Diferencias porcentuales de la actividad de las enzimas PPO y LOX para los distintos tratamientos con respecto al testigo sano y al testigo inoculado (**) para raíces de soja, 37 días después de la aplicación. (M.p: *Macrophomina phaseolina*, glifo: glifosato).

4.3.4. Relación entre la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa en raíz 37 DDA, las UFC/g de raíz y los tratamientos

Cuando se incluyeron todas las enzimas en el análisis de componentes principales (PCA), el índice KMO fue bajo. Si el índice KMO está próximo a 1, el PCA se puede hacer. Si el índice es bajo (próximo a 0), el PCA no será relevante (Beavers *et al.*, 2013).

Se consideró descartar las enzimas GR, LOX y PAL por presentar valores de KMO igual o menores a 0.30 indicando que esas variables aportan poco en la explicación de la variabilidad total de los datos. El nuevo PCA con el resto de las variables permitió obtener un mejor índice KMO.

Los resultados del análisis de componentes principales con las siete variables se presentan más abajo. En la Tabla 4.11, se observa que la primera componente explica el 71% de la variabilidad total de las observaciones, mientras que la segunda componente explica un 27%. Entre ambas componentes se explica el 98% de la variabilidad total. Las variables CAT y GPOX están fuertemente correlacionadas en forma inversa con la primera componente, mientras que UFC/g de raíz y GSH están altamente correlacionadas en forma directa. TBARS y β 1,3 glucanasa también presentan correlación positiva pero algo más débil (Tabla 4.12). En el gráfico Biplot (Fig. 4.28) se puede observar que el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn se relaciona con mayores valores de la actividad de CAT y de GPOX y, por lo tanto, con menores valores de UFC de/g raíz. Con un comportamiento opuesto, el tratamiento M.p + Phi Mn se relaciona con mayores valores de UFC/g raíz. La segunda componente separa el contenido de TBARS, y las actividades de PPO y de β 1,3 glucanasa con mayores valores para el testigo inoculado (*M. phaseolina*) y al contenido de GSH, con mayores valores para el tratamiento M.p + glifosato.

Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	4,97	0,71	0,71
2	1,89	0,27	0,98
3	0,14	0,02	1,00
4	0,00	0,00	1,00
5	0,00	0,00	1,00
6	0,00	0,00	1,00
7	0,00	0,00	1,00

Tabla 4.11 Autovalores y proporción de la variabilidad total explicada por las distintas componentes (Análisis de Componentes Principales).

Variables	CP 1	CP 2
UFC/g raíz	0,98	0,07
TBARS	0,65	0,75
GSH	0,86	-0,50
CAT	-0,97	-0,01
GPOX	-0,98	0,15
PPO	-0,70	0,71
β 1,3 glucanasa	0,67	0,74

Correlación cofenética= 1.000

Tabla 4.12 Correlación de las distintas componentes con las variables originales (Análisis de Componentes principales).

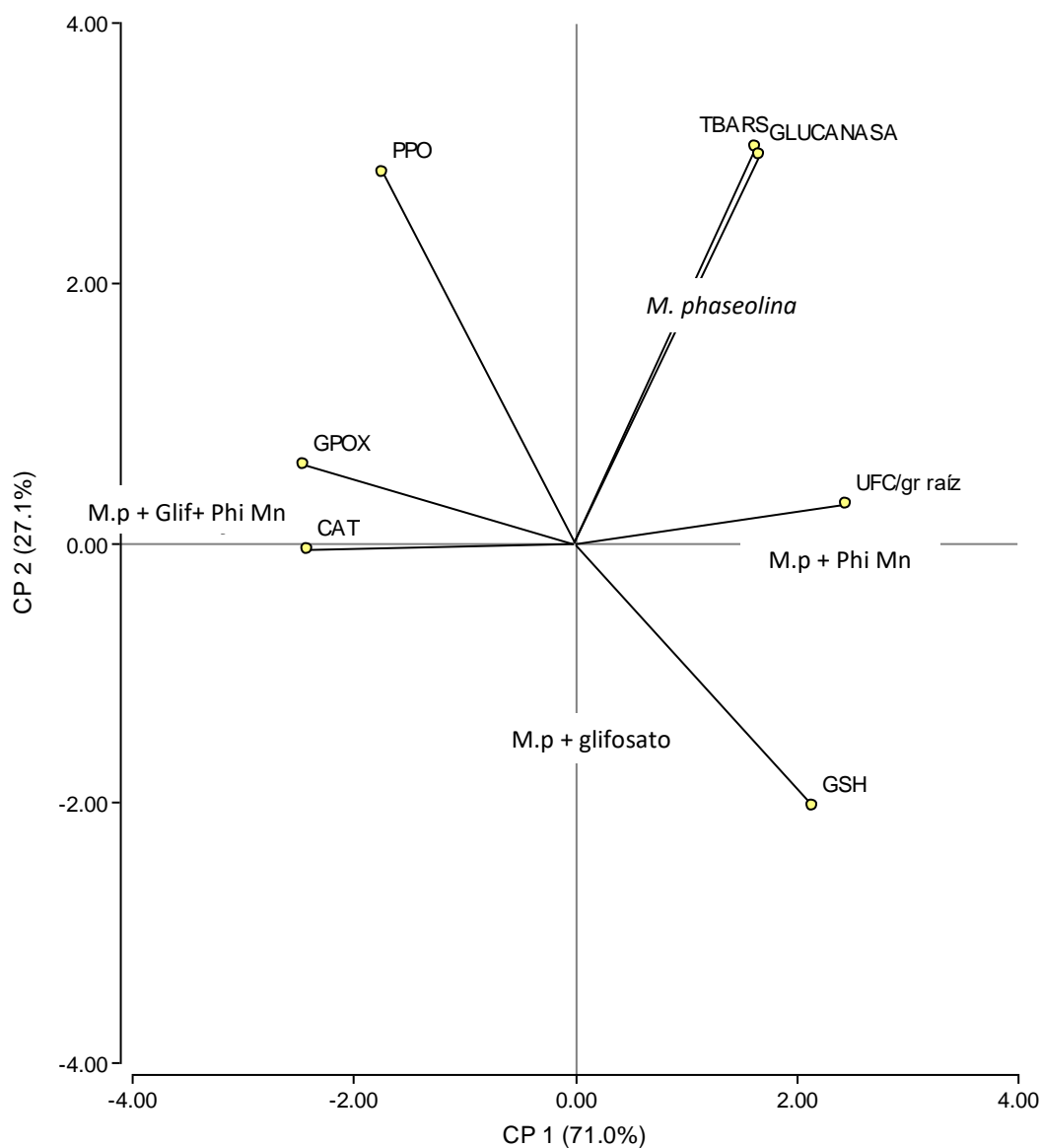


Figura 4.28 Biplot de la relación entre las enzimas antioxidantes y de defensa y parámetros del estrés oxidativo con las UFC de *M. phaseolina*/g de raíz y los tratamientos probados en raíces de soja, 37 días después de la aplicación (Análisis de Componentes principales).

4.4- DISCUSIÓN

En este capítulo se comprobó que el hongo *M. phaseolina* genera un aumento significativo tanto en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo, como en la actividad de las enzimas antioxidantes en plantas de soja (Fig. 4.29). Lo cual coincide con lo registrado por Ashry y Mohamed (2012) en hojas de lino infectado con mildew pulverulento (*Oidium lini* Skoric).

El patógeno también provocó la inducción de la mayoría de las enzimas de defensa analizadas (Fig. 4.30, 4.32 y 4.33). Además, presentó una relación clara con el contenido de TBARS y la actividad de β 1,3 glucanasa en el PCA. En concordancia con estos resultados, Attia *et al.* (2011) describieron un incremento de la actividad de las enzimas PAL, quitinasa, peroxidasa y β 1,3 glucanasa en hojas de soja inoculadas con *M. phaseolina* vs un testigo absoluto no inoculado.

En esta tesis las diferencias entre el testigo y el tratamiento inoculado fueron más marcadas en las raíces que en las hojas. Esto puede deberse a que *M. phaseolina* es un hongo de suelo, que penetra a través de la epidermis de la raíz y a partir de allí prosigue colonizando los tejidos vasculares de la planta.

Con respecto a la aplicación de glifosato, la misma redujo la actividad de las enzimas relacionadas con las defensas (Fig. 4.30, 4.31 y 4.33) y produjo un aumento de los parámetros relacionados con el estrés (Fig. 4.29). Incluso en los casos en los que el tratamiento indujo la actividad de ciertas enzimas (GPOX y LOX, Fig. 4.29 y 4.32 respectivamente) esto se correspondió con aumentos de la peroxidación lipídica en las células, indicando que el estímulo se debió al estrés oxidativo. Consecuentemente, se acepta la hipótesis 7. Resultados similares fueron informados por Miteva *et al.* (2010).

Además, se determinó una relación directa entre los tratamientos con glifosato y el contenido de GSH (PCA; Fig. 4.28), en concordancia con lo reportado por Sergiev *et al.* (2006), quienes informaron un incremento del contenido de GSH en plantas de maíz aplicadas con el herbicida.

Quizás esa sea una de las razones por las cuales en el capítulo III se observó un incremento de la podredumbre carbonosa para el tratamiento con glifosato. La que se vio reflejada en una correlación entre las variables UFC/g de raíz y GSH en el PCA (Fig. 4.28). De todas formas, se propone continuar las investigaciones al respecto debido a que la bibliografía sobre el tema es muy escasa.

En relación al Phi Mn (con o sin *M. phaseolina*), el mismo redujo los daños oxidativos provocados en las membranas celulares e indujo la actividad de CAT, GR, GPOX, PAL y β 1,3 glucanasa (Fig. 4.29, 4.30 y 4.33). Además, generó la máxima actividad de las enzimas PAL (7 DDA) y CAT (37 DDA) en los tejidos foliares, en presencia del patógeno. Por lo tanto, se acepta la hipótesis 8: el Phi Mn reduce el estrés oxidativo de las células de la planta y estimula la actividad de ciertas enzimas de defensa, en especial aquellas que provengan de rutas metabólicas reguladas por Mn.

Ávila *et al.* (2013), notaron incrementos de la actividad de CAT de hasta un 71% cuando aplicaron Phi en poroto (*Phaseolus vulgaris*). Otros autores han informado que las plantas tratadas con Phi proporcionan una mayor actividad de peroxidasas, polifenolxidasas y quitinasas (Pereira, 2009; Gadaga, 2009). Lo mismo ocurre con la β 1,3 glucanasa. Abd-El-Kareem *et al.* (2001) registraron un incremento del 117% en la expresión de esta enzima comparada al control, en un cultivo de papa aplicado con Phi K.

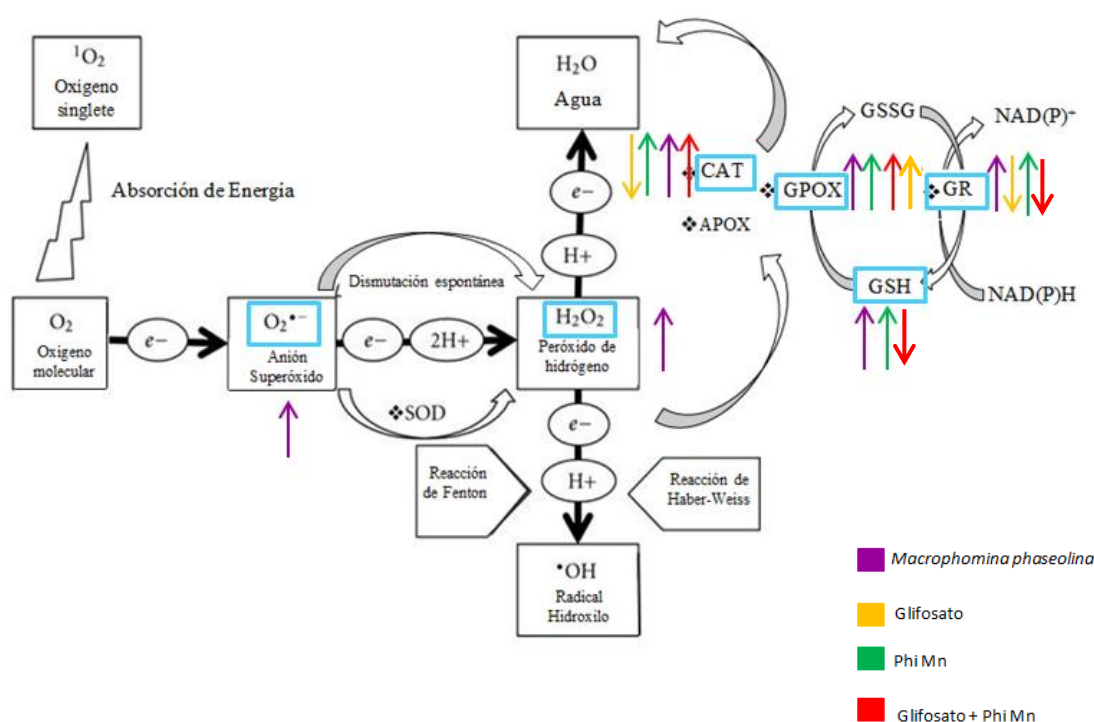


Figura 4.29 Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de los compuestos antioxidantes de la planta. Las flechas de colores indican incremento (↑) o reducción (↓) de la actividad. No se muestran las flechas en los casos en los que los tratamientos no hayan generado diferencias concluyentes. Las ERO: $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , sólo fueron medidas para *M. phaseolina*, 15 días después de la inoculación. Adaptado de Sharma et al., 2012 y Racchi, 2013.

En el PCA, el tratamiento M.p + Phi Mn (37 DDA) se vinculó con mayores valores de UFC/g raíz (Fig. 4.28). Lo que ya se había manifestado en el capítulo anterior. Las razones por las cuales esto ocurre no están claras. Por lo tanto, sería interesante realizar estudios más detallados sobre las implicancias que la aplicación de Phi Mn genera en los sistemas antioxidantes y de protección de la planta, con diferentes momentos de aplicación y distintas dosis. También sería importante evaluar la severidad de la podredumbre carbonosa en diferentes etapas del cultivo para poder establecer una relación directa entre la misma y los parámetros de resistencia de la planta.

La combinación de glifosato con Phi Mn, por su parte, produjo un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPOX (Fig. 4.29). Esto se relacionó de forma inversa con la cantidad de UFC/g raíz de *M. phaseolina* (PCA; Fig. 4.28) y se corresponde con lo observado en el capítulo III. Según De Gara et al. (2003) la alteración en la actividad de dichas enzimas podría ser un paso clave en la activación de la defensa a fitopatógenos. Se ha postulado que la actividad de CAT está implicada en la activación de la SAR y la expresión de genes relacionados con la patogénesis (Chen et al., 1993). Asimismo, se ha descubierto una clase de CAT producida en los tejidos vasculares de las plantas que podría jugar un rol en la lignificación (Willekens et al., 1994).

Por otro lado, una actividad GPOX elevada parece estar involucrada en varios procesos que tienen que ver con las respuestas de defensa a patógenos como el fortalecimiento de la membrana celular por la formación de lignina y suberina, cross-linking de componentes de la pared celular, biosíntesis de moléculas de defensa como las PA, y

detoxificación de metabolitos de las ROS (Chittoor *et al.*, 1999; Mika *et al.*, 2004; Almagro *et al.*, 2009).

El tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn también generó la mayor inducción de las enzimas de defensa PAL, PPO y β 1,3 glucanasa (4.30, 4.31 y 4.33), tanto en las hojas como en las raíces. Por todo lo expuesto se aceptó la hipótesis 9 (la aplicación de Phi Mn en conjunto con el glifosato disminuye los parámetros que tienen que ver con el estrés oxidativo e incrementa la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa de la planta, en comparación con el tratamiento de glifosato sólo).

No existen antecedentes sobre las implicancias que el glifosato y el Phi Mn en conjunto generan sobre los mecanismos de resistencia de las plantas a las enfermedades. En base a los hallazgos preliminares obtenidos en esta tesis se perfila como un tema interesante para efectuar diversas investigaciones en el futuro.

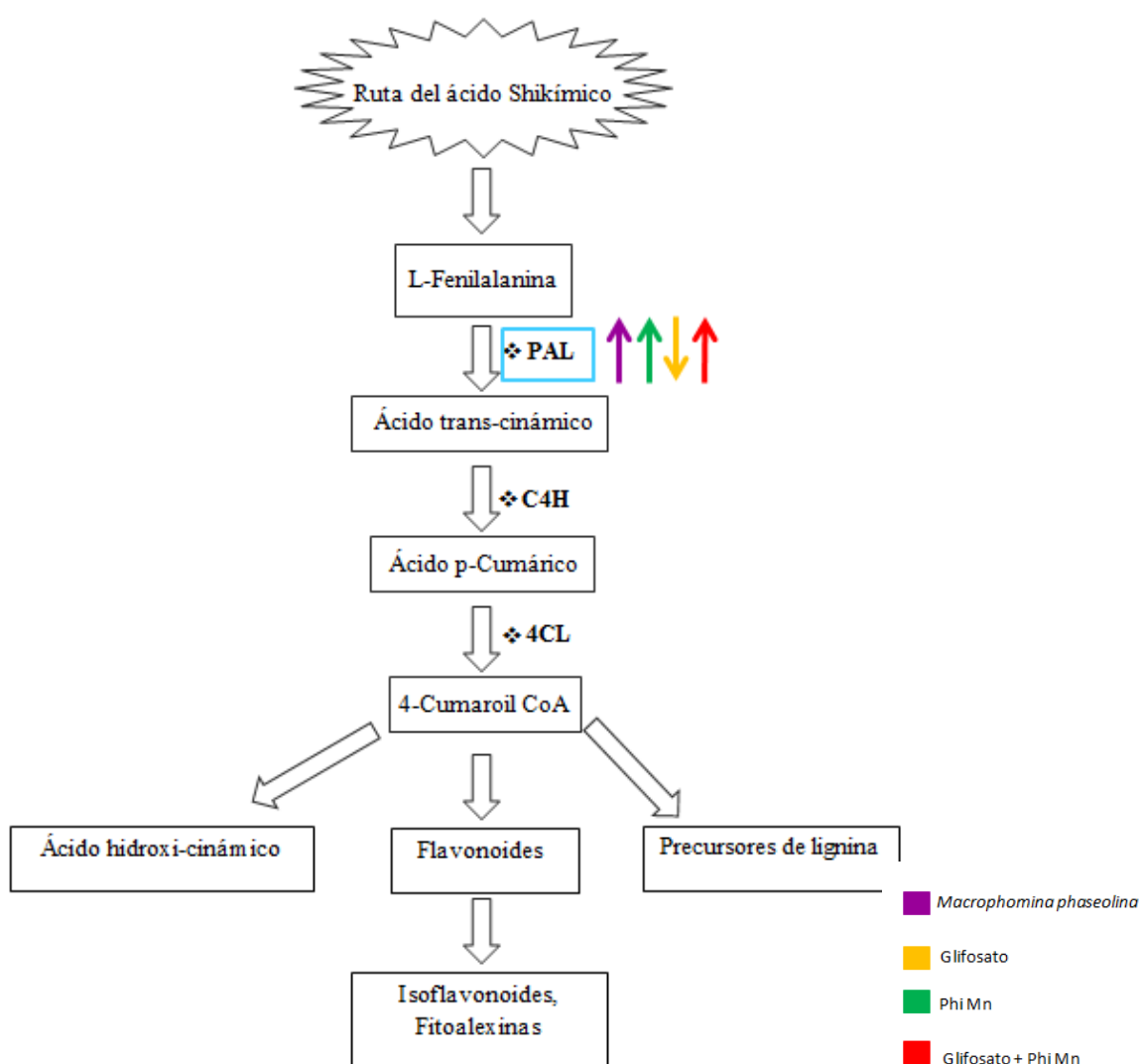


Figura 4.30 Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de la enzima PAL y, por lo tanto, los productos de la vía de los fenilpropanoides. Las flechas de colores indican incremento (↑) o reducción (↓) de la actividad de dicha enzima. Adaptado de Sriprasertsak *et al.* (2002) y Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos (2012).

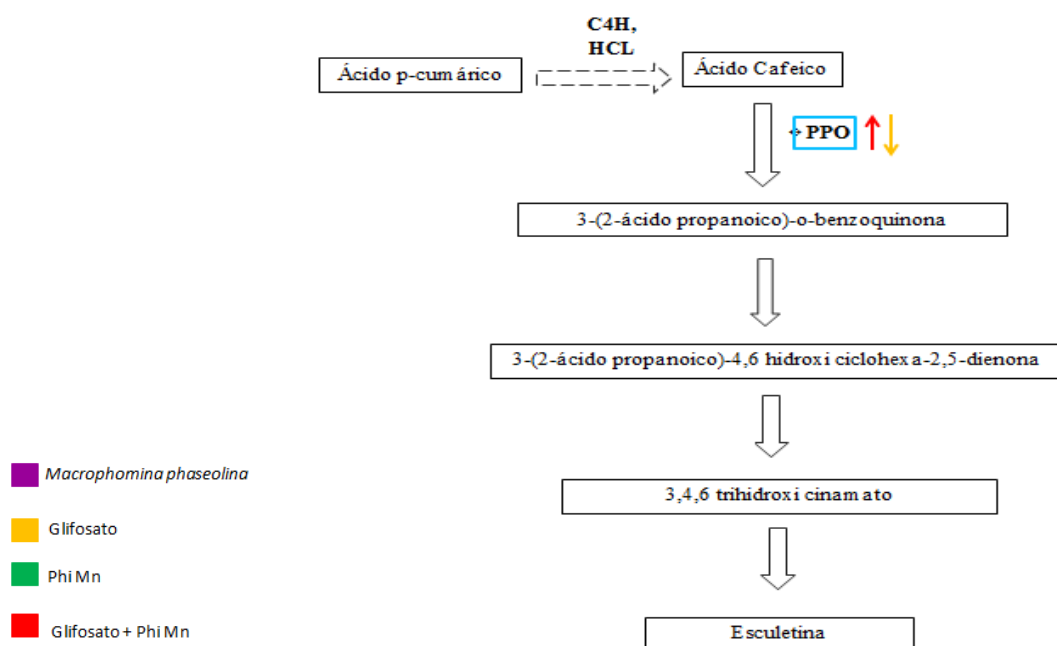


Figura 4.31 Efecto de los tratamientos glifosato (flechas amarillas) y glifosato + Phi Mn (flechas rojas) sobre la expresión de la enzima PPO. Las flechas de colores indican incremento (↑) o reducción (↓) de la actividad de dicha enzima. Los demás tratamientos no mostraron evidencias concluyentes de aumento/disminución de la actividad de la enzima. Adaptado de Sato (1967) y Arají *et al.* (2014).

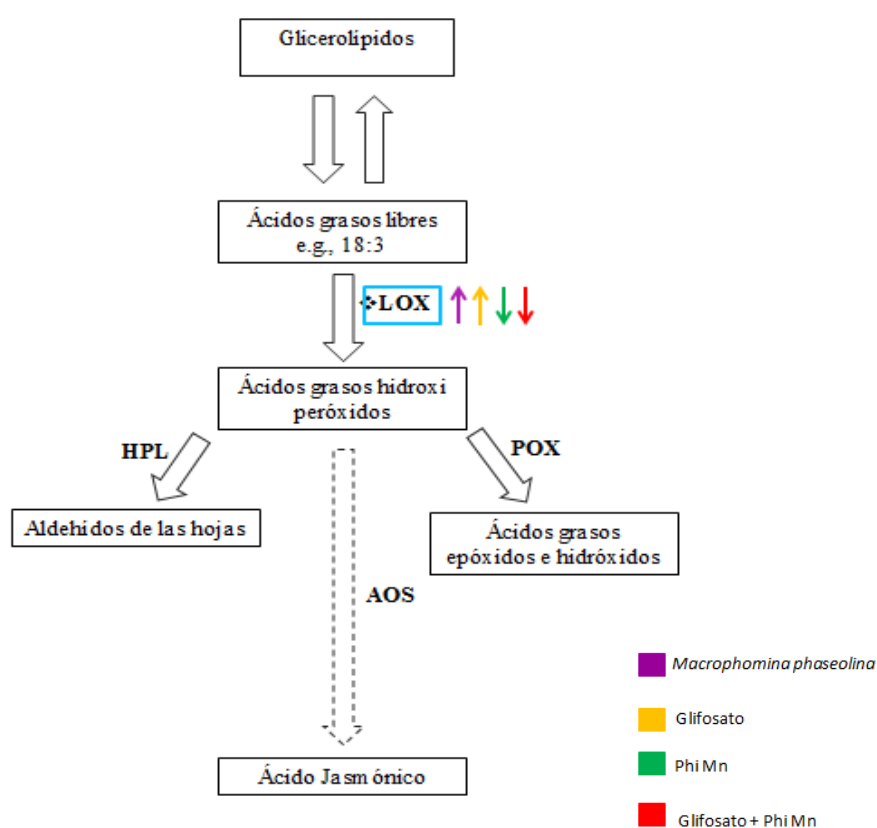


Figura 4.32 Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la enzima LOX. Las flechas de colores indican incremento (↑) o reducción (↓) de la actividad de dicha enzima. Adaptado de Robinson y Bostock (2015) y Yan *et al.* (2013).

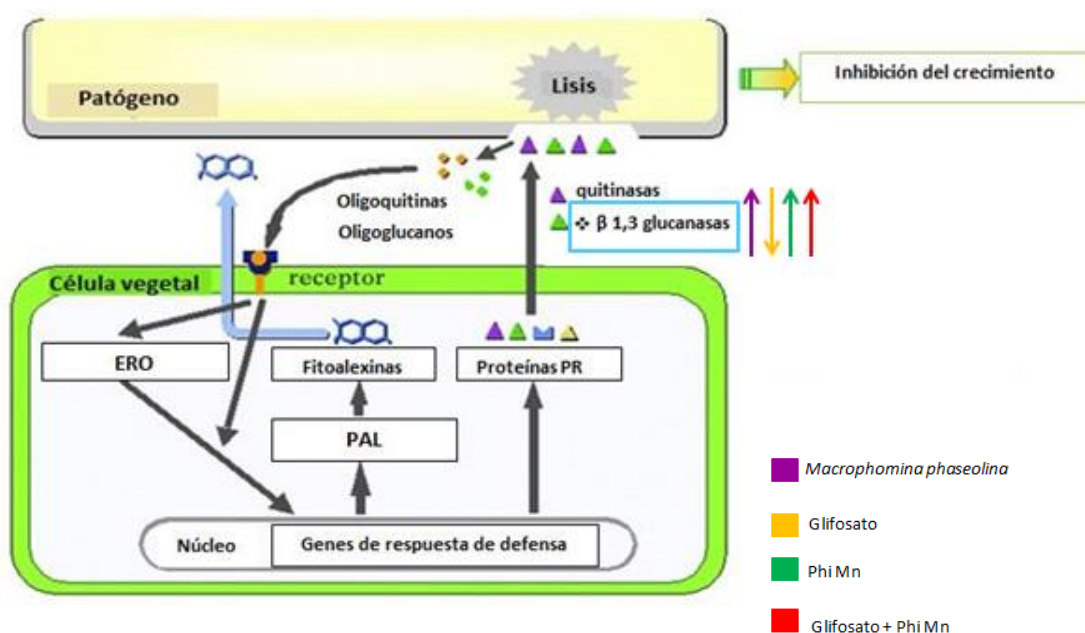


Figura 4.33 Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la enzima β 1,3 glucanasa. Las flechas de colores indican incremento (\uparrow) o reducción (\downarrow) de la actividad de la misma. Esquema adaptado de Nishizawa (2005)

4.5- CONCLUSIONES

En este capítulo se estudiaron distintos parámetros relacionados con la defensa de las plantas frente a patógenos, como criterios que tienen que ver con el estrés oxidativo (contenido de O_2^- , H_2O_2 , TBARS), actividad de compuestos antioxidantes no enzimáticos (GSH), actividad del complejo enzimático antioxidante (CAT, GR, GPOX) y la inducción de las enzimas relacionadas con la defensa (PAL, PPO, β 1,3 glucanasa, LOX).

En base a esto se llegó a la conclusión de que, en líneas generales, la combinación de glifosato con Phi Mn, genera la inducción de la batería de enzimas relacionadas con los mecanismos antioxidantes y de generación de resistencia de la planta. Este estímulo enzimático se desplegó de forma sistémica, manifestándose tanto en el sitio de aplicación (tejidos foliares) como en las raíces. La notable inducción impartida por el tratamiento M.p + glifosato + Phi Mn sobre las enzimas CAT y GPOX 37 DDA, demostró tener una correspondencia significativa con la disminución de las UFC de *M. phaseolina*/g raíz. Probablemente esto está estrechamente ligado a la disminución de la severidad de la podredumbre carbonosa observada en el capítulo III.

En este capítulo también se advirtió una tendencia perjudicial de la aplicación de glifosato, la cual demostró reducir la actividad de diferentes enzimas antioxidantes y de defensa analizadas. Esto podría generar cierta susceptibilidad de la planta a enfermedades, lo cual coincide con la tendencia descrita en el capítulo III. Sin embargo, se trata de un asunto poco investigado y que acarrea una fuerte controversia, por lo que se deberá continuar investigando.

Finalmente, el Phi Mn demostró inducir la actividad enzimática antioxidante y de defensa y reducir el estrés oxidativo de la planta. Dicha inducción fue menor a la

impartida por la mezcla de glifosato + Phi Mn y, como se detalló en el capítulo anterior, no se condijo con una reducción de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este capítulo se constituyen como una aproximación inédita al impacto que el herbicida glifosato y el bioestimulante Phi Mn generan sobre los mecanismos de resistencia de la soja a enfermedades. El efecto que los tratamientos glifosato + Phi Mn y Phi Mn presentaron sobre la estimulación de las defensas naturales de la planta implican un avance considerable en la búsqueda de estrategias de control originales para la podredumbre carbonosa. Sin embargo, quedan varios interrogantes que resolver y se requerirán numerosas investigaciones para dilucidar si dichos tratamientos pueden establecerse como herramientas complementarias para el manejo de esta enfermedad.

Capítulo V:

Consideraciones finales

Durante el desarrollo de esta tesis se estudiaron las implicancias que el glifosato, el Phi Mn y la mezcla de los mismos generan sobre distintos aspectos de la podredumbre carbonosa en soja RR. Se abarcó desde su acción directa sobre el agente causal *M. phaseolina* *in vitro*, pasando por los efectos en la severidad de la enfermedad e impacto en variables agronómicas de interés *in vivo*; hasta los efectos moleculares que dichos ingredientes activos generan sobre parámetros de estrés y actividad enzimática antioxidante y de defensa. Se plantearon diferentes objetivos e hipótesis que fueron discutidos a lo largo del texto y se arribó a distintas conclusiones.

En este capítulo se efectúa una síntesis del trabajo realizado, analizando y vinculando objetivos, hipótesis y resultados. Asimismo, se discuten las contribuciones de esta tesis al conocimiento y las líneas de investigación que podrían desprenderse de ella a futuro.

5.1.- Síntesis de los principales resultados

Al analizar las consecuencias de los tratamientos *in vitro* sobre *M. phaseolina* (objetivo 1), se observó que tanto el glifosato, el Phi Mn y la combinación de ambos presentan un impacto perjudicial sobre el desarrollo del patógeno, reduciendo visiblemente su crecimiento a altas concentraciones (capítulo II, Fig. 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5).

Sin embargo, el glifosato sólo, no afecta las estructuras de supervivencia del hongo (zona II vs. zona I del testigo; Fig. 2.6, 2.7 y 2.8). Por este motivo, la hipótesis 1 se aceptó parcialmente.

El Phi Mn fue el tratamiento de mayor fungitoxicidad con una CI_{50} de 321 ppm. Asimismo, dicho tratamiento generó cambios negativos en la pigmentación de las estructuras de supervivencia del hongo, las cuales se percibieron más claras que las del testigo y el glifosato a 300 ppm (zona IV para el Phi Mn vs zona I y II para el testigo y el glifosato, respectivamente (Adams y Baker, 1981)) (Fig. 2.1 y Fig. 2.8). Es decir, el Phi Mn incorporado al medio de cultivo, impacta negativamente en el crecimiento y en la formación de microesclerocios de *M. phaseolina* (hipótesis 2). Sin embargo, la pérdida de pigmentación más notable en los microesclerocios se produjo con el tratamiento glifosato + Phi Mn. En este caso, a 100 ppm el tratamiento mezcla se ubicó en la zona V vs zona I del testigo (Adams y Baker, 1981) (Fig. 2.1, Fig. 2.6 y 2.7). A 300 ppm la diferencia se acentuó aún más (zona VI vs zona I; Fig. 2.8). Por consiguiente, se aceptó la hipótesis 3.

En cuanto a los efectos de los tratamientos sobre la severidad de la podredumbre carbonosa (objetivo 2), el glifosato presentó una fuerte tendencia a incrementar la severidad de la enfermedad (Fig. 3.4) con un 30% más de severidad que el testigo inoculado. Esto coincide con lo observado por algunos autores (Geisler *et al.*, 2002; Zaccaron, 2013; Johal y Huber, 2009; Hornby *et al.*, 1998; Brammall y Higgins, 1988; Babiker *et al.*, 2011; Descalzo *et al.*, 1996); pero se contrapone con lo reportado por otros (Mengistu *et al.*, 2013; Canaday *et al.*, 1986; Anderson y Kolmer, 2005; Kandel *et al.*, 2015). Sin embargo, dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa; por lo cual, la hipótesis 4 fue rechazada.

El Phi Mn no sólo no disminuyó la severidad de la enfermedad sino que la realzó ligeramente (Fig. 3.4 y Tabla 3.1). Consecuentemente, la hipótesis 5 fue rechazada. Sin embargo, este resultado no se corresponde con lo esperado de acuerdo a la bibliografía consultada (Guest y Grant, 1991; Lobato *et al.*, 2008, 2010; Simonetti *et al.*, 2015), a otros experimentos realizados previamente *in vitro* (detallados más arriba, capítulo II) y

a la inducción enzimática antioxidante y de defensa de la planta observada en el capítulo IV. Por otro lado, si bien la aplicación de este tratamiento no tuvo efecto sobre la enfermedad, sí generó un aumento de la biomasa radical de las plantas de soja (Fig. 3.7).

En cuanto al tratamiento mezcla, éste redujo la severidad de la enfermedad de forma significativa (Fig. 3.4), 30% respecto del testigo inoculado y 47% respecto del tratamiento con glifosato (M.p + glifosato) (Tabla 3.1). Por lo tanto, se aceptó la hipótesis 6.

En referencia al impacto de los tratamientos evaluados sobre el sistema de resistencia de la planta (objetivo 3), en la mayoría de los casos, la actividad de las enzimas anti estrés y de defensa de la planta se vio estimulada por la presencia del patógeno *M. phaseolina*, siendo los tratamientos que contenían el hongo los de mayor inducción. Esto se observó claramente en un experimento preliminar efectuado para comprobar si la inoculación del patógeno había sido exitosa (Fig. 4.6 (1), (2), (3), (4), (6) y (7); Tablas 4.3 y 4.4).

Además, se determinó que la aplicación de glifosato, tanto en presencia como en ausencia del patógeno, en general, produce una reducción de la actividad enzimática antioxidante y de defensa en toda la planta (Fig. 4.9 (1) y (2); Fig. 4.10 (1), (2), (3) y (4); Fig. 4.13 (2); Fig. 4.14 (1), (2) y (3); Fig. 4.18 (1); Fig. 4.21 (1), (2) y (3)) y un aumento del daño a la membrana (Fig. 4.7 (1); Fig. 4.15; Fig. 4.19 (1)). Resultados similares fueron obtenidos por Ahsan *et al.* (2008) en arroz y Moldes *et al.* (2008) en soja. Consiguientemente, se aceptó la hipótesis 7.

El Phi Mn, con y sin patógeno, aumentó el contenido de GSH (Fig. 4.1; Tabla 4.6) y la actividad de enzimas antioxidantes y de defensa (Fig. 4.9 (1); Fig. 4.13 (1), (2) y (3); Fig. 4.10 (1) y (3); Fig. 4.14 (1); Fig. 4.17 (3); Fig. 4.18 (1); Fig. 4.21 (1) y (3); Fig. 4.22 (2)). Además, redujo el daño oxidativo en la planta (Fig. 4.11 (2), Fig. 4.15, Fig. 4.19 y Fig. 4.23 (2) y (3)) en coincidencia con lo observado por Saindrenan y Guest (1995) y Alexandre *et al.* (2014). Por lo tanto, se puede decir que la hipótesis 8 fue aceptada.

La combinación de glifosato con Phi Mn, especialmente cuando la planta se encontraba inoculada, estimuló la expresión de las enzimas de resistencia y antioxidantes (Fig. 4.9 (1) y (3); Fig. 4.10 (3); Fig. 4.13 (3); Fig. 4.14 (1); Fig. 4.17 (3) y (4); Fig. 4.18 (1), (2) y (3); Fig. 4.21 (1) y (3)). Así como también la disminución del perjuicio generado por las ROS (Fig. 4.11 (2); Fig. 4.15 (con patógeno); Fig. 4.19 (con patógeno); Fig. 4.23 (2)). Incluso se determinó que este tratamiento estimula la actividad de las enzimas CAT y GPOX, las cuales, de acuerdo al PCA, presentan una relación inversamente proporcional con la severidad de la enfermedad (UFC/g raíz) (Fig. 4.28; Tabla 4.12). Por ende, se aceptó la hipótesis 9.

En resumen, se ha detectado una tendencia clara del glifosato a incrementar la severidad de la podredumbre carbonosa en soja RR (capítulo III). Este efecto puede relacionarse con la merma de la actividad antioxidante, de defensa y el mayor estrés oxidativo observado para este tratamiento a nivel molecular (capítulo IV). También, en aplicaciones *in vitro* el glifosato redujo el crecimiento de *M. phaseolina* sin afectar a sus microesclerocios (capítulo II).

El Phi Mn disminuyó significativamente el desarrollo micelial del patógeno *M. phaseolina* en condiciones *in vitro*, afectando también en forma negativa a sus estructuras de supervivencia a dosis altas (capítulo II). También, al ser aplicado sobre la soja, provocó la inducción de enzimas relacionadas con la resistencia y reducción del estrés, tanto en presencia como en ausencia del hongo (capítulo IV). Sin embargo, esto no estuvo asociado con el control de la enfermedad en la planta (capítulo III).

Finalmente, a lo largo de toda la tesis, los resultados más contundentes se observaron para el tratamiento glifosato + Phi Mn. Se evidenció que la aplicación de este tratamiento *in vitro* perjudica el desarrollo micelial de *M. phaseolina*, a la vez que provoca cambios nocivos en sus estructuras de supervivencia (capítulo II). En la soja RR inoculada, la combinación del herbicida con el fitoestimulante induce la resistencia y disminuye el daño oxidativo mediante la expresión de enzimas antioxidantes, enzimas de defensa y PRP (capítulo IV). Estos procesos se traducen en un descenso de la severidad de la podredumbre carbonosa (capítulo III).

5.2.- Avances logrados en el conocimiento

Existen en la literatura varios trabajos que estudian la biología y distintas estrategias de manejo del patógeno polífago *M. phaseolina* (Gupta *et al.*, 2012; Ploper *et al.*, 2001). Sin embargo, dichas investigaciones se centran en la sensibilidad del hongo a diferentes fungicidas para tratamientos de semilla o de suelo, control biológico (Reznikov *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2001; Gopalakrishnan *et al.*, 2011), prácticas culturales (Ndiaye, 2007; Todd *et al.*, 1987; Wrather *et al.*, 1998) y la búsqueda de cultivares resistentes (Wrather *et al.*, 2008; Talukdar *et al.*, 2009; Mengistu *et al.*, 2007). Contrariamente, son escasos los estudios que analizan la alternativa de los fitoestimulantes (Abd El-Hai *et al.*, 2009; El-Metwally y Sakr, 2010) y, más específicamente, de los Phi para el control de este patógeno de suelo (Ravotti, 2012).

Si bien se comprobó la efectividad de los Phi K en la reducción de diversas enfermedades (Lobato *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2012), poco se conoce acerca de la acción de los Phi Mn sobre la resistencia de la planta y su mecanismo de acción dentro de la misma. Estos productos han sido utilizados mayormente en cultivos intensivos, y es limitada la información atinente a su impacto sobre las enzimas de protección y antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en cultivos extensivos como la soja. En este trabajo se probó que los Phi Mn inducen la actividad de las enzimas antioxidantes y de defensa, y reducen el estrés oxidativo. Sin embargo, la inducción de la resistencia en la planta no fue suficiente para disminuir la severidad de la enfermedad.

Con respecto al glifosato, aunque existen numerosas investigaciones sobre la función del mismo en la susceptibilidad a las enfermedades en las plantas, al día de hoy no se han obtenido resultados claros que permitan finalizar la controversia que existe alrededor de este tema. Algunos autores resaltan el impacto negativo del glifosato, alegando que favorece la proliferación de microorganismos perjudiciales en la rizósfera y el aumento de la susceptibilidad de las plantas a los mismos (Geisler *et al.*, 2002; Zaccaron, 2013; Johal y Huber, 2009; Babiker *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2006). Otros, en cambio, resaltan las propiedades fungitóxicas del herbicida frente a ciertos patógenos biotróficos (Feng *et al.*, 2005; Anderson y Kolmer, 2005). Finalmente, en otras investigaciones no se detectaron diferencias en la susceptibilidad a enfermedades de las plantas tratadas con glifosato vs las no tratadas (Kandel *et al.*, 2015; Barnett *et al.*, 2011, 2012; Kirk *et al.*, 2013; Mengistu *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2012; Marchiosi *et al.*, 2009). En esta tesis, se observó una tendencia clara del herbicida a incrementar los niveles de la enfermedad. Los resultados obtenidos en relación a la expresión enzimática de la soja aplicada con glifosato constituyen un aporte relevante, ya que son escasos los estudios que analizan los efectos de este herbicida directamente sobre la actividad enzimática de defensa a patógenos, en cultivos RR.

La información sobre el efecto que el glifosato causa en combinación con los Phi Mn en relación a las enfermedades es prácticamente nula, encontrándose sólo artículos que se focalizan en el rendimiento de la soja (Ferraris y Couretot, 2012) y evaluaciones de

fitotoxicidad frente a esta mezcla en maíz RR (Gomes *et al.*, 2013). El presente trabajo es el primero en reportar que dicha combinación no sólo aumenta la expresión de las enzimas antioxidantes y de defensa en general, además disminuye significativamente la severidad de la podredumbre carbonosa en soja RR sin causar fitotoxicidad y presenta un efecto perjudicial directo sobre el patógeno y sus microesclerocios.

5.3.- Aplicaciones futuras

La disminución en el contenido de melanina podría ser de importancia para reducir la acumulación de patógenos en el suelo si éstos poseen estructuras de supervivencia con paredes pigmentadas (Butler *et al.*, 2005). Por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo II, se podría inferir que utilizando los tratamientos de glifosato + Phi Mn y, en menor medida, el de Phi Mn sólo, se lograría una reducción en el inóculo inicial de *M. phaseolina* en el lote.

Asimismo, la reducción de la severidad de la podredumbre carbonosa generada por la combinación de glifosato + Phi Mn, descrita en el capítulo III, constituye un avance preliminar inédito para el manejo de esta enfermedad. Como ya fuera mencionado a lo largo de esta tesis, en la actualidad, el manejo de la misma se efectúa mediante prácticas culturales y la aplicación de fungicidas a la semilla, lo cual resulta poco eficiente (Jeyarajan *et al.*, 1991). Los hallazgos aquí presentados establecen la base para nuevas investigaciones que ratifiquen esta combinación de activos como una alternativa química eficiente para el control de este hongo de suelo mediante aplicaciones foliares. Lo cual constituiría una herramienta de manejo más simple y conveniente para los productores.

Finalmente, los resultados obtenidos en el capítulo IV contribuyeron al entendimiento de los cambios en la resistencia de la planta producidos por los distintos tratamientos. También explicaron, en parte, los efectos de los formulados observados sobre la intensidad de la enfermedad. Estos descubrimientos son de utilidad como plataforma inicial de futuras investigaciones que intenten generar y/u optimizar opciones para el control de *M. phaseolina*. Sin embargo, es importante destacar que estos resultados se obtuvieron a partir de experimentos realizados en condiciones controladas de invernáculo. Se trata de experimentos preliminares que dan una idea general sobre el comportamiento de estos tratamientos sobre plantas de soja RR infectadas artificialmente con *M. phaseolina*. Esta investigación debería servir de base y ser el primero de numerosos nuevos estudios que profundicen en los distintos temas planteados.

5.4.- Implicancias futuras

Será necesario repetir los experimentos efectuados en invernáculo, con un mayor número de réplicas para corroborar si el incremento de la severidad de la enfermedad observado para el tratamiento de glifosato puede resultar estadísticamente significativo. Asimismo, sería interesante probar si la mezcla con Phi Mn afecta la capacidad herbicida del glifosato.

Adicionalmente, resultaría conveniente evaluar un mayor número de aplicaciones de Phi Mn, así como también diferentes momentos de aplicación y/o distintas dosis midiendo, a su vez, la severidad a distintos tiempos. Esto permitirá esclarecer las causas por las cuales en este trabajo los fitoestimulantes *in vivo* no resultaron tan efectivos como se esperaba en base a la bibliografía (Hardy *et al.*, 2001; Thao y Yamakawa, 2009) y a la inducción enzimática observada en el capítulo IV.

Asimismo, medir las variaciones en la batería enzimática causadas por los distintos tratamientos en una mayor cantidad de momentos ayudaría a establecer los períodos claves de aplicación para asegurar la inducción de la resistencia en la planta. Por otro lado, sería importante determinar las concentraciones de Mn en los distintos tejidos de la planta, con el fin de comprender cuáles son las implicancias de las mismas sobre la resistencia a enfermedades.

Igualmente, sería interesante probar estos tratamientos sobre diferentes patógenos tanto *in vitro* como en la planta, para ver si reaccionan de forma similar a *M. phaseolina*.

Del mismo modo, investigar si la pérdida de pigmentación constituye una merma en la viabilidad de los microesclerocios y cuál es la relación entre la coloración y su capacidad de sobrevivir, arrojaría luz sobre los resultados del capítulo II.

Por otro lado, resultará imprescindible trasladar al campo los experimentos, a los efectos de validar las conclusiones presentadas en esta tesis con distintos tipos de suelo, diferente clima, disponibilidad hídrica y demás factores bióticos y abióticos de estrés que podrían influir sobre los resultados aquí obtenidos.

Los hallazgos aquí expuestos podrían constituir un aporte inédito y significativo para el control de *M. phaseolina* en soja RR; contribuyendo a generar nuevas alternativas prácticas y eficaces para el manejo de la podredumbre carbonosa, que faciliten las tareas de los productores y aporten a los rendimientos para conseguir un sistema de producción agrícola sustentable.

Capítulo VI:

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hai, K. M.; El-Metwally, M. A; El-baz, S. M.; Zeid, A.M. 2009. The use of antioxidants and microelements for controlling dumping-off caused by *Rhizoctonia solani* and Charcoal Rot caused by *Macrophomina phaseolina* on Sunflower. *Plant Pathology Journal* 8(3): 79-89.
- Abd-El-Kareem, F.; Abd-Alla, M. A.; El-Mohamedy; R.S.R. 2001. Induced resistance in potato plants for controlling late blight disease under field conditions. *Egypt. J. Phytopathol.* 29: 29 – 41
- Adams, A.; Baker, R. 1981. The negative. The Ansel Adams photography series/Book 2. Little, Brown and Company Ed., Time Warner Group, 287 pp.
- Agrios G.N. 1998. Fitopatología, 3era Edición, México, 838 pp.
- Ahsan, N.; Lee, D. G.; Lee K.W.; Alam, I.; Lee, S.H.; Bahk, J.D.; Lee, B. H. 2008. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 1062–1070.
- Albrigo, L. G. 1999. Effects of foliar applications of urea or Nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 112:1-4
- Alexandre, E. R.; Herculano, L. M.; da Silva, J. M.; Alves de Oliveira, S. M. 2014. Fosfitos no manejo da antracnose do Jiló. *Pesq. agropec. bras.* 49(12) :930-938
- Almagro, L.; Gómez Ros, L. V.; Belchi-Navarro, S.; Bru, R.; Ros Barceló, A.; Pedreño, M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60: 377–390
- Almeida, A.M.R.; Amorim, L.; Bergamin, F.; Torres, A. E.; Farias, J. R. B.; Benato, L.C.; Pinto, M.C.; Valentim, N. 2002. Progress of soybean charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. *Fitopatología Brasileira* 28:131–135.
- Altman, J., Campbell, C. L., 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15: 361–385.
- Anderson, J. A.; Kolmer, J. A. 2005. Rust control in glyphosate tolerant wheat following application of the herbicide glyphosate. *Plant Dis.*, 89 :1136–1142
- Anderson, M. E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-55.
- Andreu, A. B. 2006. Determinación del grado resistencia-susceptibilidad a la fusariosis en tubérculos semillas de variedades industriales. Informe técnico Mc Cain Argentina S. A., 20.
- Araji, S.; Grammer, T. A.; Gertzen, R.; Anderson, S. D.; Mikulic-Petkovsek, M.; Veberic, R.; Phu, M. L.; Solar, A.; Leslie, C. A.; Dandekar, A. M.; Escobar, M. A. 2014. Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiology*, 164(3), 1191–1203. <http://doi.org/10.1104/pp.113.228593>

- Aránguiz, F.; Gaete, H.; Hidalgo, M. E.; Lobos, G. 2009. Daño oxidativo en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a aguas receptoras de un efluente minero en del río blanco (v región, chile). *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 9, 2417-2422
- Ashry, N. A., Mohamed, H. I. 2012. Impact of secondary metabolites and related enzyme in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology* 11:1073-1077.
- Assis, J. S.; Maldonado, R.; Muñoz, T.; Escribano, M. I.; Merodio, C. 2001. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 23: 33-39.
- Attia, M.; Awad, N. M.; Azza, S. H.; Hamed, T.H.A. 2011. Induction of defense responses in soybean plants against *Macrophomina phaseolina* by some strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Applied Sciences Research* 7(11):1507-1517.
- Ávila, F. W.; Faquin, V.; da Silva, L. A. K.; Ávila, P. A.; Marques, D. J.; Guedes, E. M. S.; Tan, Y. D. K. 2013. Effect of phosphite supply in nutrient solution on yield, phosphorus nutrition and enzymatic behavior in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Aust. J. Crop Sci.* 7: 713-722.
- Axelrod, B. 1974. Lipxygenases, *ACS. Adv. Chem. Ser.*, 136: 324-348.
- Babiker, E. M.; Hulbert, S. H.; Schroeder, K. L.; Paulitz, T. C. 2011. Optimum timing of preplant applications of glyphosate to manage *Rhizoctonia* root rot in barley. *Plant Disease* 95:304-310
- Bakker, P. A.; Pieterse, C. M; van Loon, L. C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97: 239–243 10.1094/PHYTO-97-2-0239
- Balestrasse, K. B.; Gardey, L.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 497-504.
- Barnett, K. A.; Sprague, C. L.; Kirk, W. W.; Hanson, L. E. 2011. Lack of interaction between glyphosate and fungicide treatments on *Rhizoctonia* crown and root rot in glyphosate-resistant sugarbeet. *J. Sugar Beet Res.* 48: 1-16.
- Barnett, K. A.; Sprague, C. L.; Kirk, W. W.; Hanson, L. E. 2012. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* crown and root rot (*Rhizoctonia solani*) in glyphosate-resistant sugarbeet. *Weed Sci.* 60: 113-120.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.; Irigoyen, J. J.; Sanchez-Díaz, M. 1986. Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* 82: 1169-1171
- Beckman, C. H. 2000. Phenolic-Storing Cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in Wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant Pathol.* 57:101-110.

- Belkis, P.; Ondina, L. 2011. Interacciones hospedante-patógeno: Logros y perspectivas en Cuba. *Rev. Protección Veg* 26(3): 137-143.
- Bell, A. A.; Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 411-51
- Benbrook, C. M. 2012. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S.: the first sixteen years. *Environmental Sciences Europe* 2012: 24:24 doi:10.1186/2190-4715-24-24
- Blagbrough, I. S.; Bayoumi, S. A.; Rowan, M. G.; Beeching, J. R. 2010. Cassava: an appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. *Phytochemistry* 71: 1940–1951
- Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 46, pp. 189–214.
- Borthakur, A. B.; Bhat, B. G.; Ramadoss, C. S. 1987. The positional specification of the oxygenation of linoleic acid catalyzed by two forms of lipoxygenase isolated from Bengal gram (*Cicer arietinum*). *J bioscience.*, 11: 257-263.
- Bórtoli, P. V.; Verdenelli, R. A.; Conforto, C.; Vargas-Gil, S.; Meriles, J. M. 2012. Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecología Austral* 22: 33-42.
- Bowers, G. R.; Russin, J. S. 1999. Soybean disease management. In: Soybean production in the mid-south. L. G. Heatherly and H. F. Hodges. CRC Press.
- Bozzo, M. A. 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis de Maestría. Universidad de la Republica, Facultad de Ciencias: Maestría en Ciencias Ambientales. Montevideo, Uruguay
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Brammall, R. A.; Higgins, V. J. 1988. The effect of glyphosate on resistance of tomato to *Fusarium* crown and root rot disease and on the formation of host structural defensive barriers. *Canadian Journal of Botany*, 66(8): 1547-1555
- Browne, G. T.; Viveros, M. A. 2005. Effects of phosphonate and mefenoxam treatments on development of perennial cankers caused by two *Phytophthora* spp. on almond. *Plant Disease* 89: 241-249
- Butler, M. J.; Gardiner, R. B.; Day, A. W. 2005. Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biological Control* 32: 326–336.
- Cabrera, M. G.; Gutiérrez, S. A.; Alvarez, R. E.; Raimondo, M. R.; Gómez, D. E. 2001. Podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), en soja sometida a estrés hídrico en el Nordeste de la Argentina. XXXIV Congreso Brasileiro y XI Congreso Latino-Americano de Fitopatología. São Pedro, SP, Brasil, agosto 2001.

- Cakmak, I.; Yazici, A.; Tutus, Y.; Ozturk, L. 2009. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant Soybean. *European Journal of Agronomy* 31, 3: 114-19.
- Camarena Gutiérrez, G; de la Torre Almaráz, R. 2007. Resistencia sistémica adquirida: estado actual. *Revista Chiapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 13(2): 157-162. Universidad Autónoma Chapingo. México
- Canaday, C. H.; Helsel, D. G.; Wyllie, T. D. 1986. Effects of herbicide induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 70: 863–866
- Carmona, M.; Abello, A.; Sautua, F.; Gally, M. 2006. Fertilizantes foliares para el manejo de las enfermedades de fin de ciclo de la soja en el sur de Santa Fe. Mercosoja 2006, 3er Congreso de Soja del Mercosur, Rosario 27 al 30 de junio de 2006. pp. 326-328.
- Carmona, M.; Gally, M.; Sautua, F. 2009. Identificación y Manejo de las Enfermedades. Manual del cultivo de soja / Fernando Oscar García; Ignacio Antonio Ciampitti; Héctor Baigorri. pp 99-127. Editores- 1a ed. - Buenos Aires: *International Plant Nutrition Institute*, 2009. 180 p. ISBN 978-987-24977-0-5
- Carmona, M.; Reis, E. M. 2012. Enfermedades en cultivos bajo siembra directa en Argentina y Brasil: pasado, presente y prospectivas de manejo. *Revista Soja* 2012, AAPRESID 63-75.
- Carmona, M.; Sautua, F. 2011. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. *Plantio Direto*. Novembro/dezembro 2011: 19-22.
- Carpenter, J.; Gianessi, L. 1999. Herbicide tolerant soybeans: Why growers are adopting Roundup Ready varieties. *AgBioForum*, 2(2): 65-72
- Chaluvaraju, G.; Basavaraju, P.; Shetty, N. P.; Deepak, S. A.; Amruthesh, K. N.; Shetty, H. S. 2004. Effect of some phosphorous-based compounds on control of pearl millet downy mildew disease. *Crop Protection*, 23: 595-600
- Chamorro, M.; Miranda, L.; Domínguez, P.; Medina, J. J.; Soria, C.; Romero, F.; López Aranda, B.; De los Santos, B. 2015. Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. *Crop Protection*, 67: 279–286
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527-6057
- Chawla, S.; Bowen, C. R.; Slaminko, T. L.; Hobbs, H. A.; Hartman, G. L. 2013. A public program to evaluate commercial soybean cultivars for pathogen and pest resistance. *Plant Disease*, 97:568-578. DOI: 10.1094/PDIS-05-12-0479-FE.
- Chen, C.; Bélanger, R. R.; Benhamou, N.; Paulitz, T. C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56(1):13-23.
- Chen, Z.; Silva, H.; Klessig, D. F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886

- Chittoor, J. M.; Leach, J. E.; White, F. F. 1999. Induction of peroxidase during defense against pathogens. p. 171–193. In: S. K. Datta and S. Muthukrishnan (eds.). Pathogenesis: related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Cho, U. H.; Seo, N. H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168 (1): 113–120
- Cohen, Y.; Coffey, M. D. 1986. Systemic Fungicides and the Control of Oomycetes. *Annual Reviews Phytopathology* 24, 311-338..
- Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas. (Fungicide Resistance Action Comitee; FRAC). 2014. Resistance overview. <http://www.frac.info/resistance-overview>
- Conde, A. P. 2011. Efecto del glifosato sobre comunidades microbianas benéficas y patógenas del suelo en Uruguay. Tesis de Maestría en biología opción microbiología. PEDECIBA. Laboratorio de microbiología de suelos – CIN, Facultad de Ciencias.
- Constabel, C.; Yip, J.; Patton, L.; Christopher, M. 2000. Polyphenol Oxidase from hybrid poplar cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 124: 285-295.
- Creelman, R. A.; de Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355–381
- Croft, K. P. C.; Juttner, F.; Slusarenko, A. J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiol* 101:13–24
- Datnoff, L. E.; Rodrigues, F. A.; Seebold, K. W. 2007. Silicon and plant disease. In: Mineral nutrition and plant disease, pp. 233–246. Eds L. E. Datnoff, W. H. Elmer and D. M. Huber. St. Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society
- De Gara, L.; de Pinto, M. C.; Tommasi, F. 2003. The antioxidant systems vis à vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol Biochem* 41: 863-870
- Descalzo, R. C.; Punja, Z. K.; Levesque, C. A.; Rahe, J. E. 1996. Identification and role of *Pythium* species as glyphosate synergists on bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in different soils. *Mycological Research* 100:971-978.
- Díaz Rönner, L. 2005. La incorporación de nuevas tecnologías y algunos de sus componentes problemáticos en el modelo agrícola argentino del siglo XXI. *Theomai Journal* número especial 2005 (Actas 1º Jornadas Interdisciplinarias Theomai sobre Sociedad y Desarrollo) http://revista-theomai.unq.edu.ar/numespecial2005/artdiazronner_numesp2005.htm
- Dietrich, R.; Ploss, K.; Heil, M. 2004. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* 27, 896–906.
- Dixon, R. A.; Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7): 1085–1097. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085

- Dubey, P.; Gupta G. P.; Dubey, R. C. 2012. Culture filtrates of plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) strains VR1 and VR2 inhibit growth and sclerotia germination of *Macrophomina phaseolina* *in vitro*. *New York Science Journal* 5(8): 1-8
- Duke, S. O., Baerson, S. R.; Rimando, A. M. 2003. Herbicides: Glyphosate. In Encyclopedia of agrochemicals, J. R. Plimmer, D. W. Gammon, and N.N. Ragsdale, eds., John Wiley & Sons, New York. <http://www.mrw.interscience.wiley.com/eoa/articles/agr119/frame.html>
- Durrant, W. E.; Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42: 185–209
- Edgington, L. V.; Khew, K. L.; Barrow, G. L. 1971. Fungitoxic spectrum of Benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61(1): 42-44.
- El-Metwally, M. A.; Sakr, M. T. 2010. A novel strategy for controlling damping-off and charcoal rot diseases of Sunflower plants grown under calcareous-saline soil using spermine, potassium and zinc. *Plant Pathology Journal* 9(1):1-13
- Eshraghi, L.; Anderson, J.; Aryamanesh, N.; Shearer, B.; McComb, J.; Hardy G.E.St.J.; O'Brien, P. A. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol* 60: 1086–1095
- Espinosa de los Monteros, M. C. 2006. Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinérea*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Fisiología y Genética. Laboratorio de Microbiología. Universidad de Cádiz. Puerto Real, Cádiz, España.
- Evans, I. R., Solberg, E., Huber, D. M., 2007. Copper and plant disease. In: Datnoff, L.E., Elmer, W.H., Huber, D. M. (Eds.), Mineral nutrition and plant disease. APS Press, St. Paul, MN, pp. 177–188 (Chapter 12).
- Fehr, W.R.; Caviness, C. E. 1977. Stages of soybean development. Iowa St. Univ. Special Report 80, 11 p
- Feng, P. C. C.; Baley, G. J.; Clinton, W. P.; Bunkers, G. J.; Alibhai, M. F., Paulitz, T. C.; Kidwell, K. K. 2005. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48: 17290-17295.
- Ferraris, G.; Couretot, L. 2012. Tratamientos de fertilización complementaria en soja. Proyecto Regional Agrícola Campaña 2011/2012. INTA EEA Pergamino. UCT Agrícola - Área de Desarrollo Rural
- Fogarty, R. V.; Tobin, J. M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol.* 19(4):311-7.
- Fuentes-Silva, D.; Rodríguez-Romero, A. 2006. Endo- β -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 15: 35-42

- Gadaga, S. J. C. 2009. Fosfitos na proteção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) contra a antracnose. Universidade Federal de Lavras, Brasil. Dissertação (Mestrado em Agronomia) 82 p.
- Garbelotto, M.; Harnik, T.Y.; Schmidt, D. J. 2009. Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* *in vitro* and *in planta*. *Plant Pathology* 58:111-119.
- Geisler, L., Graef, G., Wilson, J., Schimelfenig, J., 2002. Interaction of glyphosate tolerance with soybean cyst nematode resistance. *Phytopathology* 92, S529.
- Gill-Langarica, H. R.; Mayek-Pérez, N. 2008. Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Rev. mex. fitopatol* [online] 26(2): 164-176. ISSN 0185-3309.
- Gisi, U.; Sierotzki, H.; Cook, A.; McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, 58: 859-867
- Gomes, G. L. G. C.; Velini, E. D.; Carbonari, C. A.; Trindade, M. L. B. 2013. Efeitos da associação de glyphosate e fosfito em plantas de milho. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 12(1): 78-86.
- Gomes, M. P.; Smedbol, E.; Chalifour, A.; Hénault-Ethier, L.; Labrecque, M.; Lepage, L.; Lucotte, M.; Juneau, P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J. Exp. Bot.* 65 (17): 4691-4703.
- Gómez-Vásquez, R.; Day, R.; Buschmann, H.; Randles, S.; Beeching, J. R. and Cooper, R. M. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany*, 94 (1): 87-97.
- Gopalakrishnan, S.; Kiran, B. K.; Humayun, P.; Vidya, M. S.; Deepthi, K.; Jacob, S.; Vadlamundi, S.; Alekhya, G.; Rupela, O. 2011. Biocontrol of charcoal-rot of sorghum by Actinomycetes isolated from herbal vermicompost. *African Journal of Biotechnology* 10 (79): 18142-18152
- Guest, D. I.; Bompeix, G. 1990. The complex mode of action of phosphonates. *Australas. Plant Pathology*. 19: 113-115.
- Guest, D. I.; Grant, B.R. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews*. 66, 159-87.
- Gupta, K. G.; Sharma, S. K.; Ramteke, R. 2012. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *J Phytopathol* 160:167-180
- Hardy, G. S. J.; Barrett, S.; Shearer, B. L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, 30(2): 133-139.

- Hartman, G. L.; Sinclair, J. B.; Rupe, J. C. 1999. Phomopsis Seed Decay. Compendium of soybean diseases. 4th Edn, APN Press, St. Paul MN., USA., pp: 31-32
- Hartzler, B. 2010. Glyphosate interactions with micronutrients and plant diseases. Iowa State University, University Extension, Weed Science, Department of Agronomy. <http://www.weeds.iastate.edu/mgmt/2010/glyMndisease.pdf>
- Helander, M.; Saloniemi, I.; Saikkonen, K. 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in plant Science* 17(10): 569-574
- Hornby, D.; Bateman, G. L.; Gutteridge, R. J.; Lucas, P.; Osbourn, A. E.; Ward, E.; Yarham, D. J. 1998. Take-all Disease of Cereals: A Regional Perspective. CAB International, Wallingford, UK. http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Macrophomina/macrophomina_phaseolina.HTM.
- Huber, D. M. 2010. AG chemical and crop nutrient interactions – current update. Fluid Fertilizer Foundation, Manhattan, KS. Proceedings Fluid Fertilizer Forum, Scottsdale, AZ 27: 14-16
- Huber, D. M., Leuck, J. D., Smith, W. C., Christmas, E. P., 2004. Induced manganese deficiency in GM soybeans. In: Northcentral Fert. Extension Conf., Des Moines, IA, November 2004
- Huber, D. M.; Cheng, M. W.; Winsor, B. A. 2005. Association of severe *Corynespora* root rot of soybean with glyphosate-killed giant ragweed. *Phytopathology* 95, S45
- Ibarra, A. E. 2014. Efectos del fosfito de manganeso sobre los principales hongos foliares necrotróficos del cultivo de maíz, garbanzo y soja. Tesis de grado. Facultad de Agronomía; Universidad de Buenos Aires.
- Ilyas, M. B.; Dhingra, O. D.; Ellis, M. A.; Sinclair, J. B. 1975. Location of mycelium of *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and *Cercospora kikuchii* in infected soybean seeds. *Plant Dis. Rep.*, 59, 17-79.
- Jacobo-Velázquez, D. A.; Cisneros-Zevallos, L. 2012. An alternative use of horticultural crops: Stressed plants as biofactories of bioactive phenolic compounds. *Agriculture* 2(3), 259-271; doi:10.3390/agriculture2030259
- Jeyarajan, R.; Ramakrishnan, G.; Rajamanickam; B.; Sangeetha; P. 1991. Field demonstrations of efficacy of *Trichoderma* as biocontrol agent for root rot disease of grain legumes and oilseeds. *Petria* 1: 143
- Johal, G. S; Huber, D. M. 2009. Glyphosate effects on diseases of plants. *Europ. J. Agronomy* 144-152
- Kandel, Y. R.; Bradley, C. A.; Wise, K. A.; Chilvers, M. I.; Tenuta, A. U.; Davis, V. M.; Esker, P. D.; Smith, D. L.; Licht, M.A.; Mueller, D. S. 2015. Effect of glyphosate application on sudden death syndrome of glyphosate-resistant soybean under field conditions. *Plant Dis.* 99:347-354.
- Kawate, S.C.; Kawate, S.; Ogg, A.G.; Kraft, J. M. 1992. Response of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* and *Pythium ultimum* to glyphosate. *Weed Sci.* 40:497-502.

- King, A. C., Purcell, L.C., Vories, E. D., 2001. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to glyphosate applications. *Agron. J.* 93:179–186.
- Kirk, W. W.; Hanson, L. E.; Sprague, C. L. 2013. Glyphosate and fungicide effects on *Cercospora* leaf spot in four glyphosate-resistant sugar beet (*Beta vulgaris*) varieties. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. Paper 1158. <http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/1158>
- Kistner, M. B. 2013. Efecto *in vitro* del fosfito de manganeso sobre hongos causantes de enfermedades de fin de ciclo en el cultivo de soja. Tesis de grado. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Klimes, A.; Dobinson, K. F. 2006. A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet Biol* 43:283–294.
- Kremer, R. J., Means, N. E., 2009. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *Eur. J. Agron.* 31, 153-161
- Kuniak, E.; Sklodowska, M. 2001. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Science*, 160(4): 723–731
- La Camera, S.; Gouzerh, G.; Dhondt, S.; Hoffmann, L.; Frittig, B.; Legrand, M.; Heitz, T. 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* 198:267-284.
- Laloi, C., Apel, K.; Danon, A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 323-328.
- Larson, R. L.; Hill, A. L.; Fenwick, A.; Kniss, A. R.; Hanson, L.E.; Miller, S.D. 2006. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* and *Fusarium* root rot in sugar beet. *Pest Manage. Sci.* 62: 1182–1192.
- Li, L.; Steffens, J. C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215, 239–247
- Liavonchanka, A.; Feussner, I. 2006. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol.* 163(3):348-57.
- Lobato, M. C.; Olivieri, F. P.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B. 2010. Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117 (3), 102-109.
- Lobato, M. C.; Olivieri, F. P.; González Altamiranda, E. A.; Wolski, E. A.; Daleo, G. R.; Caldiz, D. O.; Andreu, A. B. 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 349-358.
- Lovatt, C. J.; Mikkelsen, R. L. 2006. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do? *Better Crops* 90: 11-13

- Marchiosi, R.; Ferrarese, M. L. L.; Bonini, E. A.; Fernandes, N. G.; Ferro, A. P. Ferrarese Filho, O. 2009. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1): 28-33
- Massoud, K.; Barchietto, T.; Le Rudulier, T.; Pallandre, L.; Didierlaurent, L.; Garmier, M.; Ambard-Bretteville, F.; Seng, J. M.; Saindrenan, P. 2012. Dissecting phosphite-induced priming in *Arabidopsis* infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiology* 159(1): 286-298
- McDonald, A. E.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*. 24, 1505-1519.
- Means, N. E. 2004. Effects of glyphosate and foliar amendments on soil microorganisms in soybean. Doctoral dissertation. University of Missouri, Columbia, 131 pp.
- Mekwatanakarn, P.; Sivasithamparam, K. 1987. Effect of certain herbicides on soil microbial populations and their influence on saprophytic growth in soil and pathogenicity of the take-all fungus. *Biol. Fertil. Soils* 5, 175–180.
- Mengistu, A.; Ray, J. D.; Smith, J. R.; Paris, R. L. 2007. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science*, 47:2453-2461
- Mengistu, A.; Reddy, K. N., Bellaloui, N., Walker, E. R.; Kelly, H. M. 2013. Effect of glyphosate on *Macrophomina phaseolina* *in vitro* and its effect on disease severity of soybean in the field. *Crop Protection* 54: 23-28
- Mijangos, I.; Becerril, J. M.; Albizu, I.; Epelde, L.; Garbisu, C. 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biol. Biochem.* 41: 505–513
- Mika, A.; Minibayeva, F.; Beckett, R.; L  thje, S. 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* 3(1-2): 173-193
- Miteva, LP-EP-E., Ivanov, S. V., Alexieva, V. S. 2010. Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 131–136
- Moffat, A. S. 1992 Improving plant disease resistance. *Science* 257: 482-483
- Moldes, C. A.; Olivera Medici, L.; Silva Abrahao, O.; Tsai, S. M.; Antunes Azevedo, R. 2008. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. *Acta Pysiol. Plant* 30: 469-479.
- Ndiaye, M. 2007. Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. Wageningen, the Netherlands: Wageningen University, PhD thesis
- Nelson, E. B., 1990. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant Soil* 129: 61–73

- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- Nishizawa, Y. 2005. Roles of chitinases and beta-1,3-glucanases in plant defense. GlycoForum, Glycobiology in plant defense: PS-A04. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycobiology/PS-A04E.html>
- Noriega, G. O.; Balestrasse, K. B.; Batlle, A.; Tomaro, M. L. 2007. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of δ -aminolevulinic acid. *Biometals* 20: 841-851.
- Olivieri, F. P.; Feldman, M. L.; Machinandiarena, M. F.; Lobato, M. C.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B. 2012. Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens. *Crop Protection*, 32: 1-6.
- Pal, K. K.; Tilak, K. V. B. R.; Saxena, A. K.; Dey, R.; Singh, C. S. 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 156(3), 209-223.
- Pan, S. Q.; Ye, X. S.; Kuc, J. 1991. Association of β -1, 3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Pernospora tabacae* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 39: 25-39.
- Parchmann, S.; Gundlach, H.; Mueller, M. J. 1997. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* 115:1057–1064.
- Partridge, D. 2005. *Macrophomina phaseolina*, a project for soilborne plant pathogens. Department of plant pathology. College of Agriculture and Life Sciences, NC State University. USA
- Pastor-Corrales, M. A.; Abawi, G. S. 1988. Reactions of selected bean accessions to infection by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 72: 39-41, 11 ref.
- Pearson, C. A. S.; Schwenk, F. W.; Crowe, F. J.; Kelley, K. 1984. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 68: 1086–1088
- Pereira, V. F. 2009. Fosfitos no manejo do míldio da videira: eficácia e modo de ação. Universidade Federal de Lavras, Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) 69 p.
- Pérez Brandan, C.; Díaz, C.; Carmona, M.; March, G. 2009. Comportamiento de variedades de soja frente a infecciones naturales de la podredumbre carbonosa de la soja (*Macrophomina phaseolina*) en Salta (Argentina). EEAA Marcos Juárez Ed: INTA, pp. 41-45, ISSN 1851-9245
- Pieterse, C. M. J.; Leon-Reyes, A.; Van der Ent, S.; Van Wees, S. C. M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5(5): 308-316

- Ploper, D.; Gonzalez, V.; Ramallo, N.; Gálvez, R.; Devani, M. 2001. Presencia de la podredumbre carbonosa del tallo de la soja en el centro y noroeste argentino. *EEAOC - Avance Agroindustrial* Junio: 1- 5
- Pnueli, L.; Liang, H.; Rozenberg, M.; Mittler, V. 2003. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, vol. 34, no. 2, pp. 187–203
- Porta, H.; Rocha-Sosa, M. 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* 130(1): 15-21
- Powles, S. B. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science* 64(4): 360-365
- Racchi, M. L. 2013. Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants* 2(4), 340-369; doi:10.3390/antiox2040340
- Ravotti M.; Simonetti E.; Scandiani M.; Luque A.; Formento, N., Carmona M. 2012. Control *in vitro* de fitopatógenos habitantes del suelo que atacan al cultivo de soja mediante el uso de fosfitos. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas (JFA). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina p 16
- Ravotti, M. E. 2012. Control *in vitro* de hongos fitopatógenos habitantes del suelo en el cultivo de soja mediante el uso de fosfitos. Tesis de grado. Facultad de Agronomía; Universidad de Buenos Aires.
- Rebollar-Alviter, A.; Madden, L.V.; Ellis; M.A. 2007. Pre- and post-infection activity of azoxystrobin, pyraclostrobin, mefenoxam, and phosphite against rot of strawberry, caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* 91:559-564.
- Reis, E. M.; Bogorni, R.; Zanatta, M. 2012. Glifosato como ativador da resistência sistêmica adquirida no controle da ferrugem asiática em cultivares de soja resistentes ao herbicida. *Plantio Direto* - novembro/dezembro de 2012: 34-36
- Reis, E. M.; Reis, A. C.; Carmona, M. A. 2010. Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas. Passo Fundo: UPF
- Reis, E. M.; Zanatta, M.; Carmona, M.; Menten, J. O. M. 2015. Relationship between IC₅₀ determined *in vitro/in vivo* and the fungicide rate used in the field. *Summa Phytopathologica* 41 (1): 49-53
- Reznikov, S.; González, V.; Vellicce, G.; Castagnaro, A. P.; Ploper, L. D. 2011. Evaluación de curasemillas químicos y biológicos para el control de la podredumbre carbonosa de la soja. *Análisis de semillas*, 5(19): 112-118.
- Robinson, S. M.; Bostock, R. M. 2015. β -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant–oomycete interactions: past and present. *Front. Plant Sci.* 5:797. doi: 10.3389/fpls.2014.00797
- Rohrbach, K. G.; Schenk, S. 1985. Control of Pineapple Heart Rot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamomi*, with Metalaxyl, Fosetyl Al, and Phosphorous Acid. *Plant Disease* 69: 320-323

- Saindrenan, P.; Guest, D. 1995. Guaiacol peroxidase. In: Daniel M, Purkasyastha RP (eds) Handbook of phytoalexin metabolism and action. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Sanogo, S.; Yang, X.B.; Scherm, H. 2000. Effects of the herbicides on *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate tolerant soybean. *Phytopathology* 90: 57-66.
- Sato, M. 1967. Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts III. Phenolase as an enzyme concerning the formation of esculetin. *Phytochemistry* 6: 1363–1373
- Scandalios, J. G. 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci.* 27(9):483-6.
- Schaedle, M.; Bassham J.A. 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology* 59: 1011-12.
- Scheirer, C.; W. Ray; N. Hare. 1976. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. *Biometrics* 32: 429-434.
- Schupp, R.; Rennenberg, H. 1988. Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* [Karst.] L.). *Plant Science* 57, 113-17
- Sergiev, I.G.; Alexieva, V.S.; Ivanov, S.V.; Moskova, I.I.; Karanov, E.N. 2006. The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pest. Biochem. Physiol.* 85: 139–146.
- Shaner, G., Abney, S.; Scott, D. 1999. Charcoal rot of soybeans. Department of Botany and Plant Pathology. Purdue University. W. Lafayette, USA.
- Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, vol. 2012, Article ID 217037, 26 pages. doi:10.1155/2012/217037
- Sharville, E. G. 1961. The nature and uses of modern fungicides. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Sheikh, A. H.; Ghaffar, A. 1979. Relation of sclerotial inoculum density and soil moisture to infection of field crops by *Macrophomina phaseolina*. *Pak J Biol* 11:185–189.
- Simonetti, E.; Pin Viso, N.; Montecchia, M.; Zilli, C.; Balestrasse, K.; Carmona, M. 2015. Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. *Microbiological Research* <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.004>
- Sriprasertsak, P.; Raweerotwiboon, A.; Yamada, T.; Sutrabutra, T. 2002. Function of the promoter of PSPAL2, a pea defensive gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 36: 361 - 369
- Stiles, C. M.; Datnoff, L. E.; Cisar, J. L. 2005. Evaluation of fungicides for control of Pythium blight in overseeded turfgrasses using a simple field inoculation technique. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2005-0330-01-RS

- Talukdar, A.; Verma, K.; Gowda, D. S.; Lal, S. K.; Sapra, R. L.; Singh, K. P., Singh, R.; Sinha, P. 2009. Molecular breeding for charcoal rot resistance in soybean I. Screening and mapping population development. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 69(4): 352-360.
- Thakur, M.; Sohal, B. S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, Volume 2013, Article ID 762412, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/762412>
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Science & Plant Nutrition* 55: 228–234
- Thipyapong, P.; Joel, D.; Steffens, J. 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*. 40:673-676.
- Thorpe, G. W.; Fong, C. S.; Alic, N.; Higgins, V. J.; Dawes, I. W. 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci*. 101: 6564-6569.
- Tobar, N. E.; Elesgaray, A. M.; Spagnoletti, F. N.; Seijas, C. S.; Lavado, R. S.; Carmona, M. A. 2014. Impacto de la fertilización con K y Mn sobre la severidad de la podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*) en plantas de soja. 3er Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán 2014.
- Todd, T. C.; Pearson, C. A. S.; Schwenk, F. W. 1987. Effect of *Heterodera glycines* on charcoal rot severity in soybean cultivars resistant and susceptible to soybean cyst nematode. *Journal of nematology*, 19(Annals 1), 35.
- Tonin, R. F. B.; Avozani, A.; Durante Danelli, A. L.; Reis, E. M.; Zoldan, S. M.; Garcés-Fiallos, F. R. 2013. *In vitro* micelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. *Pesq. Agropec. Trop.*, 43(4): 460-466
- Torgeson, D. C. 1967. Determination and measurement of fungitoxicity. In: Torgeson, D. C. Fungicides: An advanced treatise. New York: Academic Press, 1967. p. 162-167
- Trigo, E. J. 2011. Quince Años de Cultivos Genéticamente Modificados en la Agricultura Argentina. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología – ArgenBio. http://www.argenbio.org/adc/uploads/15_anos_Estudio_de_cultivos_GM_en_Argentina.pdf
- Tula, M. F. 2013. Efecto de los fitoestimulantes con fosfito y con mezcla de fungicidas sobre el control de la severidad de las enfermedades foliares causadas por *Cercospora Kikuchii*, *Cercospora Sojina* y *Septoria Glycines*, y sobre el rendimiento del cultivo de soja. Trabajo de intensificación para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo otorgado por Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía.
- Valiente, C.; Díaz, K.; Gacitúa, S.; Martinez, M.; Sanfuentes, E.; 2008. Control of charcoal root rot in *Pinus radiata* nurseries with antagonistic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 24: 557-568
- Valland, G. E.; Goodman, R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.

- van Loon, L. C. 2000. Systemic induced resistance. *In* AJ Slusarenko, RSS Fraser, LC van Loon, eds, *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp 521–574
- van Loon, L. C.; van Strien, E. A. 1999 The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2): 85–97
- Vawdrey, L. L.; Grice, K. E.; Peterson, R. A.; de Faveri, J. 2004. The use of metalaxyl and potassium phosphonate, mounds, and organic and plastic mulches, for the management of *Phytophthora* root rot of papaya in far northern Queensland. *Australasian Plant Pathology* 33:103–107. doi: 10.1071/AP03087
- Vera, M. S. 2011. Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. *Acta Toxicol. Argent.* 19 (2): 87-88
- Walters, D.; Walsh, D.; Newton, A.; Lyon, G. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* 95: 1368– 1373
- Weber, H.; Chételat, A.; Caldelari, D., Farmer, E. E. 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11:485–493.
- Wicks, T. J.; Magarey, P. A.; Wachtel, M. F.; Frensham, A. B. 1991. Effect of postinfection applications of phosphorous (phosphonic) acid on the incidence and sporulation of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Plant Dis.*, 75: 40–43
- Willekens, H.; Langebartels, C.; Tire, C.; Van, M. M.; Inze, D.; Van, C. W. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 10450-10454.
- Wrather, J. A.; Shannon, J. G.; Carter, T. E.; Bond, J. P.; Rupe, J. C., Almeida, A. M. R. 2008. Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Health Progress*, 10.
- Wrather, J.A.; Kendig, S.R.; Tyler, D. D. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. *Plant Dis.*, 82 : 247–250
- Yan, Y.; Borrego, E.; Kolomiets, M. V. 2013. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses. *Lipid metabolism*, Prof. Rodrigo Valenzuela Baez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0944-0, InTech, DOI: 10.5772/52675. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/jasmonate-biosynthesis-perception-and-function-in-plant-development-and-stress-responses>
- Zaccaron, M. L. 2013. Effect of infection site and glyphosate application on the foliar symptoms expression of soybean sudden death syndrome. Graduate Theses and Dissertations. Paper 13474.
- Zilli, C. G.; Santa-Cruz, D. M.; Yannarelli, G. G.; Noriega, G. O.; Tomaro, M. L.; Balestrasse, K. B. 2009. Heme oxygenase contributes to alleviate salinity damage in *Glycine max* L. leaves. *International Journal of Cell Biology* doi:10.1155/2009/848516.

- Zobiolo, L. H. S.; de Oliveira R. S. Jr.; Huber, D. M.; Constantin, J.; de Castro, C.; de Oliveira, F. A.; Oliveira A. D. Jr. 2010. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. *Plant Soil* 328:57-69.

Apéndice

7. - APÉNDICE

7.1- COMPOSICIÓN DEL GLIFOSATO** UTILIZADO:

glifosato, N-fosfonometil glicina* 64,7 g;
 Inertes y coadyuvantes..... 100ml;
 *equivalente ácido 48%
 **marca comercial: Total Super (Cheminova)

7.2- COMPOSICIÓN DEL PHI MN** UTILIZADO:

Mn tenor soluble en agua..... 9,0% (148,0 g/l)
 P₂O₅ soluble en agua..... 40,0% (660,0 g/l)
 S soluble en agua..... 5,5% (90,75 g/l)

**marca comercial: Ultra Mn (Spraytec)

7.3- COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO** UTILIZADO:

Turba de musgo *Sphagnum* de fibras medias, perlita, compost de corteza, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes, fertilizantes.

7.3.1- Propiedades físico-químicas:

M.O.....85-90%
 C.E.....0,3 – 0,45 mmhos/cm (2:1)*
 pH.....5,2 – 5,8 corregido (2:1)*

*Sin tener en cuenta poros de aire

**marca comercial: Growmix Multipro (Terrafertil)

7.4- SOLUCIÓN MADRE DE GLIFOSATO

Dada la fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

Donde: **Ci**: Concentración inicial; **Vi**: Volumen inicial; **Cf**: Concentración final; **Vf**: Volumen final

- Suponiendo que el Vf es de 10ml (en el cual se desean obtener tener por ej., 20ppm)
- Suponiendo que se pipetea 1ml

$$10\text{ml} * 20\text{ppm} = 1\text{ml} * 200\text{ ppm}$$

$$1\text{ppm} = 1\mu\text{g} / 1000\text{ml}$$

$$100\mu\text{l sol} \dots\dots\dots 48\mu\text{g glifosato}$$

$$x \dots\dots\dots 200\mu\text{g}$$

$$x = 416,6 / 100\text{ ml sol.}$$

$$20\text{ppm} \dots\dots\dots 0,1\text{ml}$$

$$60\text{ppm} \dots\dots\dots 0,3\text{ml}$$

$$100\text{ppm} \dots\dots\dots 0,5\text{ml}$$

$$140\text{ppm} \dots\dots\dots 0,7\text{ml}$$

En 22 ml de agar:

$$20\text{ ppm} \dots\dots\dots 0,22\text{ ml}$$

$$60\text{ ppm} \dots\dots\dots 0,66\text{ ml}$$

$$100\text{ ppm} \dots\dots\dots 1,1\text{ ml}$$

$$140\text{ ppm} \dots\dots\dots 1,54\text{ ml}$$

$$280\text{ ppm} \dots\dots\dots 3,08\text{ ml}$$

$$560\text{ ppm} \dots\dots\dots 6,16\text{ ml}$$

$$1120\text{ ppm} \dots\dots\dots 12,32\text{ ml}$$

7.5- INÓCULO DE *M. phaseolina* SOBRE ARROZ

Primeramente, se colocaron 500 gr de arroz grano largo fino 0000 en una bolsa para horno y se le adicionaron 20 ml de agua destilada. Se cerró la bolsa y se envolvió con papel de diario (dos envolturas).

Se llevó a autoclave a 120 °C por 30 min. Cumplido este paso, se agregaron 20 ml más de agua destilada al arroz; se cerró nuevamente la bolsa, se envolvió y se autoclavó por segunda vez a 120 °C por otros 30 min.

Más tarde, en cámara de flujo laminar, con un tip estéril se cortaron 25 discos de 6 mm de micelio de *Macrophomina phaseolina*. Con aguja histológica se llevaron los discos a la bolsa. Finalmente, se agregaron 20 ml de agua destilada estéril y se agitó bien. Se cerró y envolvió 2 veces en un nuevo papel de diario.

Se incubó en oscuridad a 28 °C. Se controló y agitó enérgicamente la bolsa cada 2 días hasta que el hongo colonizó todo el sustrato (Pastor Corrales y Abawi, 1988).